

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/018493

International filing date: 10 December 2004 (10.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2003-415760
Filing date: 12 December 2003 (12.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 10 February 2005 (10.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

14.12.2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 1 2 月 1 2 日
Date of Application:

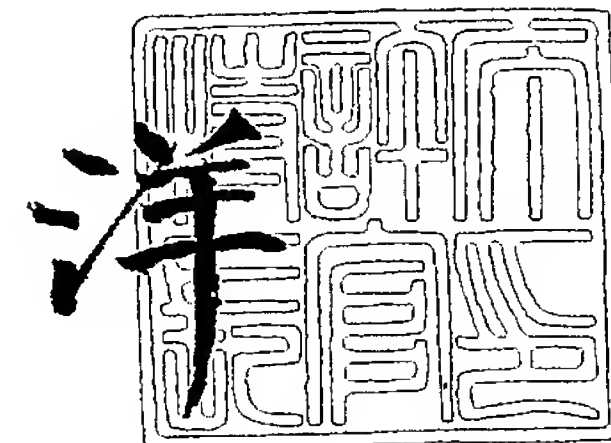
出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 4 1 5 7 6 0
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 4 1 5 7 6 0]

出 願 人 中 外 製 薬 株 式 有 限 公 司
Applicant(s):

2 0 0 5 年 1 月 2 7 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 C1-A0321
【提出日】 平成15年12月12日
【あて先】 特許庁長官殿
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県新治郡新治村永井 1 5 3 - 2 中外製薬株式会社内
 【氏名】 大友 俊彦
【発明者】
 【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内
 【氏名】 藪田 尚弘
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県新治郡新治村永井 1 5 3 - 2 中外製薬株式会社内
 【氏名】 角田 浩行
【発明者】
 【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内
 【氏名】 土屋 政幸
【特許出願人】
 【識別番号】 000003311
 【氏名又は名称】 中外製薬株式会社
【代理人】
 【識別番号】 100102978
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 清水 初志
【選任した代理人】
 【識別番号】 100108774
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 橋本 一憲
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 041092
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1
 【包括委任状番号】 0216136

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

2つ以上の重鎖可変領域と、2つ以上の軽鎖可変領域をリンカーで結合し、一本鎖ポリペプチドにすることにより、抗体の活性を増強させる方法。

【請求項 2】

抗体の重鎖可変領域と軽鎖可変領域を含む第一のポリペプチドと、抗体の重鎖可変領域と軽鎖可変領域を含む第二のポリペプチドをリンカーで結合することにより、抗体の活性を増強させる方法。

【請求項 3】

抗体を sc(Fv)₂ にすることにより、抗体の活性を増強させる方法。

【請求項 4】

活性がアゴニスト活性である請求項 1～3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

リンカーがペプチドリinkerであることを特徴とする、請求項 1～4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

ペプチドリinkerの長さが5～30アミノ酸であることを特徴とする、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

ペプチドリinkerの長さが12～18アミノ酸であることを特徴とする、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

ペプチドリinkerの長さが15アミノ酸であることを特徴とする、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

請求項 1～8 のいずれかに記載の方法により、活性が増強された抗体。

【請求項 10】

以下の工程を含む、請求項 9 に記載の抗体の製造方法。

- (a) 2つ以上の抗体重鎖可変領域、2つ以上の抗体軽鎖可変領域、及び各可変領域を結合するペプチドリinkerをコードするDNAを作製する工程、
- (b) 該DNAを含むベクターを作製する工程、
- (c) 該ベクターを宿主細胞に導入する工程、
- (d) 該宿主細胞を培養する工程

【請求項 11】

DNAが、2つの重鎖可変領域、2つの軽鎖可変領域、3つのペプチドリinkerをコードしていることを特徴とする、請求項 10 に記載の製造方法。

【請求項 12】

DNAが、重鎖可変領域、ペプチドリinker、軽鎖可変領域、ペプチドリinker、重鎖可変領域、ペプチドリinker、軽鎖可変領域の順でコードしていることを特徴とする、請求項 11 に記載の製造方法。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 抗体の活性を増強させる方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗体の活性を増強させる方法に関する。

【背景技術】

【0002】

抗体は血中での安定性が高く、抗原性も少ないことから医薬品として注目されている。その中でも、受容体などの細胞表面に発現するタンパク質を認識し、特異的反応を細胞に生じさせることが可能なアゴニスト抗体は医薬品として有用であると考えられている。エリスロポエチン受容体に対するアゴニスト抗体(非特許文献1参照)、トロンプオエチン受容体に対するアゴニスト抗体やCD47に対するアゴニスト抗体(特許文献1および2参照)など、既に幾つかのアゴニスト抗体が報告されている。

【0003】

これらのアゴニスト抗体は、それぞれ各種アッセイ法でアゴニスト活性が測定されているが、その活性は、天然のリガンドと比較すれば、いずれも弱いものである。例えば、サイトカイン受容体ファミリーに属するトロンプオエチン受容体に対するアゴニスト抗体では、アゴニスト活性を示すためには、まずTP0受容体を2量体化させ、そのシグナルを伝達するための適当な距離をとらせることが必須である。ところが、抗体分子は2価であり、受容体の2量体化には問題ないと考えられるが、分子量が約150kDと巨大な分子であり、構造の自由度は少ないと考えられることから、結合した受容体をシグナル伝達に適した距離をとらせることが難しいため十分な活性を伝えることができないと予想される。

【0004】

【特許文献1】 国際公開第02/33072号

【特許文献2】 国際公開第02/33073号

【非特許文献1】 Elliott Sら著、J.Biol.Chem., 1996年、Vol.271(40)、p.24691-24697

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明はこのような状況に鑑みて為されたものであり、その目的は抗体の活性を増強させる方法を提供することにある。詳しくは、2つ以上の重鎖可変領域と、2つ以上の軽鎖可変領域をリンカーで結合し、一本鎖ポリペプチドとすることにより抗体の活性を増強させる方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

低分子化抗体、具体的にはDiabodyやsc(Fv)2では、分子量は約60kDと半分以下となり、さらに構造上の自由度も比較的高いと推定されることなどから、より効率的に、あるいはリガンドと同程度に、受容体を2量体化することも可能と考えられ、高い活性を示すことができるようになると思われる。

【0007】

本発明者らは、抗ヒトMpl抗体を取得・精製し、更に遺伝子工学的手法を用いて抗ヒトMpl抗体VB22Bの一本鎖抗体を作製した。更に、抗ヒトMpl抗体sc(Fv)2発現ベクターを構築し、CHO-DG44細胞で一本鎖抗体の一過性発現を行い、培養上清より抗ヒトMpl一本鎖抗体であるVB22B sc(Fv)2を取得した。なお、対照として、抗ヒトMpl抗体Diabody発現ベクターを構築し、COS7細胞を用いてその培養上清よりVB22B Diabodyを取得した。それぞれの抗体のTP0様アゴニスト活性を評価したところ、一本鎖抗体の方がアゴニスト活性が高いことが確認された。このことは、2つ以上の重鎖可変領域と、2つ以上の軽鎖可変領域をリンカーで結合し、一本鎖ポリペプチドとすることにより抗体の活性を増強できることを示している。

【0008】

つまり本発明は、抗体の活性を増強させる方法に関し、より具体的には、

- 〔1〕 2つ以上の重鎖可変領域と、2つ以上の軽鎖可変領域をリンカーで結合し、一本鎖ポリペプチドにすることにより、抗体の活性を増強させる方法、
- 〔2〕 抗体の重鎖可変領域と軽鎖可変領域を含む第一のポリペプチドと、抗体の重鎖可変領域と軽鎖可変領域を含む第二のポリペプチドをリンカーで結合することにより、抗体の活性を増強させる方法、
- 〔3〕 抗体をsc(Fv)2にすることにより、抗体の活性を増強させる方法、
- 〔4〕 活性がアゴニスト活性である〔1〕～〔3〕のいずれかに記載の方法、
- 〔5〕 リンカーがペプチドリンカーであることを特徴とする、〔1〕～〔4〕のいずれかに記載の方法、
- 〔6〕 ペプチドリンカーの長さが5～30アミノ酸であることを特徴とする、〔5〕に記載の方法、
- 〔7〕 ペプチドリンカーの長さが12～18アミノ酸であることを特徴とする、〔6〕に記載の方法、
- 〔8〕 ペプチドリンカーの長さが15アミノ酸であることを特徴とする、〔7〕に記載の方法、
- 〔9〕 〔1〕～〔8〕のいずれかに記載の方法により、活性が増強された抗体、
- 〔10〕 以下の工程を含む、〔9〕に記載の抗体の製造方法、
 - (a) 2つ以上の抗体重鎖可変領域、2つ以上の抗体軽鎖可変領域、及び各可変領域を結合するペプチドリンカーをコードするDNAを作製する工程、
 - (b) 該DNAを含むベクターを作製する工程、
 - (c) 該ベクターを宿主細胞に導入する工程、
 - (d) 該宿主細胞を培養する工程
- 〔11〕 DNAが、2つの重鎖可変領域、2つの軽鎖可変領域、3つのペプチドリンカーをコードしていることを特徴とする、〔10〕に記載の製造方法、
- 〔12〕 DNAが、重鎖可変領域、ペプチドリンカー、軽鎖可変領域、ペプチドリンカー、重鎖可変領域、ペプチドリンカー、軽鎖可変領域の順でコードしていることを特徴とする、〔11〕に記載の製造方法、に関する。

【発明の効果】

【0009】

本発明により、完全長の抗体としては、アゴニスト活性が弱いあるいは、ほとんど活性がない場合においても、低分子化、具体的にはDiabody化、あるいはsc(Fv)2化することによって、活性を上昇させることが可能となる。これにより、従来は、完全長抗体としては活性が弱いため、医薬品等として開発が困難であったものであっても、低分子化することにより、医薬品等として開発が可能となる。また、比活性が上昇することにより、生産面でも、コストを削減することが可能になる。また、低分子化抗体は、糖鎖の結合がないことから、組換え体を作製する場合においても、動物細胞、酵母、大腸菌など各種発現系の利用が可能であり、利便性が高くなる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

本発明は、2つ以上の重鎖可変領域と、2つ以上の軽鎖可変領域をリンカーで結合し、一本鎖ポリペプチドにすることにより、抗体の活性を増強させる方法を提供する。

本発明の方法により、活性が増強される抗体は如何なる抗体でもよく、マウス抗体、ヒト抗体、ラット抗体、ウサギ抗体、ラクダ抗体など、どのような動物由来の抗体でもよい。さらに、例えば、キメラ抗体、ヒト化抗体などのアミノ酸配列を置換した改変抗体でもよいし、又、各種分子を結合させた抗体修飾物、抗体断片、糖鎖改変抗体など、いかなる抗体でもよい。

又、本発明の抗体によって活性が増強される抗体は、全長抗体でもよいし、Diabodyなどの低分子化抗体でもよい。

【0011】

本発明の一本鎖ポリペプチドとしては、例えば、抗体の重鎖可変領域と軽鎖可変領域を含む第一のポリペプチドと、抗体の重鎖可変領域と軽鎖可変領域を含む第二のポリペプチドをリンカーで結合した一本鎖ポリペプチドを挙げることができる。

抗体の重鎖可変領域と軽鎖可変領域を含む第一のポリペプチドと、抗体の重鎖可変領域と軽鎖可変領域を含む第二のポリペプチドは、同一のポリペプチドでもよいし、異なるポリペプチドでもよい。第一のポリペプチドと第二のポリペプチドが異なる場合、同一の抗原又はエピトープを認識する抗体でもよいし、異なる抗原又はエピトープを認識する二種特異性抗体 (bispecific antibody) であってもよい。

【0012】

抗体の重鎖可変領域と軽鎖可変領域を含むポリペプチドの具体的な例としては、例えば、scFv (シングルチェーンFv) を挙げることができる。よって、抗体の重鎖可変領域と軽鎖可変領域を含む第一のポリペプチドと、抗体の重鎖可変領域と軽鎖可変領域を含む第二のポリペプチドをリンカーで結合した一本鎖ポリペプチドとしては、sc(Fv)₂が挙げられる。sc(Fv)₂は、2つの重鎖可変領域及び2つの軽鎖可変領域をリンカー等で結合して一本鎖ポリペプチドにした抗体である (Hudson et al、J Immunol. Methods 1999; 231: 177-189)。

【0013】

sc(Fv)₂の場合、結合される2つの重鎖可変領域 (VH) と2つの軽鎖可変領域 (VL) の順序は特に限定されず、どのような順序で並べられていてもよいが、例えば、以下のような配置を挙げることができる。

[VH] リンカー [VL] リンカー [VH] リンカー [VL]
[VL] リンカー [VH] リンカー [VH] リンカー [VL]
[VH] リンカー [VL] リンカー [VL] リンカー [VH]
[VH] リンカー [VH] リンカー [VL] リンカー [VL]
[VL] リンカー [VL] リンカー [VH] リンカー [VH]
[VL] リンカー [VH] リンカー [VL] リンカー [VH]

本発明においては、好ましくは、[VH] リンカー [VL] リンカー [VH] リンカー [VL] の配置を有するsc(Fv)₂である。

【0014】

重鎖可変領域又は軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、置換、欠失、付加及び／又は挿入されていてもよい。さらに、重鎖可変領域と軽鎖可変領域を会合させた場合に、抗原結合活性を有する限り、一部を欠損させてもよいし、他のポリペプチドを付加してもよい。又、可変領域はキメラ化やヒト化されていてもよい。

アミノ酸の置換、欠失、付加及び／又は挿入や、ヒト化、キメラ化などのアミノ酸配列の改変は、本発明の方法により活性を増強させた後に行ってもよいし、又、アミノ酸配列の改変を行った後に本発明の方法により活性を増強させてもよい。

キメラ抗体は、異なる動物由来の配列を組み合わせることで作製される抗体であり、例えば、マウス抗体の重鎖、軽鎖の可変領域とヒト抗体の重鎖、軽鎖の定常領域からなる抗体などである。キメラ抗体の作製は公知の方法を用いて行うことができ、例えば、抗体V領域をコードするDNAをヒト抗体C領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得られる。

【0015】

ヒト化抗体は、再構成 (reshaped) ヒト抗体とも称され、これは、ヒト以外の哺乳動物、例えばマウス抗体の相補性決定領域 (CDR; complementarity determining region) をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている (欧州特許出願公開番号EP 125023号公報、WO 96/02576 号公報参照)。

【0016】

具体的には、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域 (framework region; FR) とを連結するように設計したDNA配列を、CDR及びFR両方の末端領域にオーバーラップ

する部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてPCR法により合成する(W098/13388号公報に記載の方法を参照)。

CDRを介して連結されるヒト抗体のフレームワーク領域は、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように、抗体の可変領域におけるフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい(Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856)。

【0017】

キメラ抗体及びヒト化抗体のC領域には、ヒト抗体のものが使用され、例えばH鎖では、C γ 1、C γ 2、C γ 3、C γ 4を、L鎖ではC κ 、C λ を使用することができる。また、抗体またはその産生の安定性を改善するために、ヒト抗体C領域を修飾してもよい。

一般的に、キメラ抗体は、ヒト以外の哺乳動物由来抗体の可変領域とヒト抗体由来の定常領域とからなる。一方、ヒト化抗体は、ヒト以外の哺乳動物由来抗体の相補性決定領域と、ヒト抗体由来のフレームワーク領域およびC領域とからなる。

【0018】

なお、キメラ抗体やヒト化抗体を作製した後に、さらに可変領域(例えば、FR)や定常領域中のアミノ酸を他のアミノ酸で置換等してもよい。抗体の可変領域の配列は、既に公知の抗体の可変領域の配列を用いてもよいし、又、任意の抗原を用いて当業者に公知の方法により抗体を作製し、その抗体の配列を取得して用いることも可能である。具体的には、例えば以下のようにして行うことができる。抗原を用いて、通常の免疫方法にしたがってマウス等の免疫動物を免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞(ハイブリドーマ)をスクリーニングする。抗原の調製は公知の方法により行うことができる。ハイブリドーマの作製は、例えば、ミルステインらの方法(Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73:3-46)等に準じて行うことができる。抗原の免疫原性が低い場合には、アルブミン等の免疫原性を有する巨大分子と結合させ、免疫を行えばよい。その後、ハイブリドーマのmRNAから逆転写酵素を用いて抗体の可変領域(V領域)のcDNAを合成し、得られたcDNAの配列を公知の方法により解読すればよい。

【0019】

又、ヒト抗体の取得方法も広く知られている。例えば、ヒトリンパ球をin vitroで感作し、感作リンパ球をヒト由来の永久分裂能を有するミエローマ細胞と融合させ、結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる(特公平1-59878号公報参照)。さらに、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原を投与して抗体産生細胞を取得し、これを不死化させた細胞から抗原に対するヒト抗体を取得してもよい(国際特許出願公開番号W0 94/25585 号公報、W0 93/12227 号公報、W092/03918 号公報、W0 94/02602 号公報参照)。

【0020】

本発明において、重鎖可変領域と軽鎖可変領域を結合するリンカーは、遺伝子工学により導入し得る任意のペプチドリinker、又は合成化合物リンカー(例えば、Protein Engineering, 9(3), 299-305, 1996に開示されるリンカー)を用いることができる。

【0021】

ペプチドリinkerの長さは特に限定されず、目的に応じて当業者が適宜選択することが可能であるが、通常、1~100アミノ酸、好ましくは5~30アミノ酸、特に好ましくは12~18アミノ酸(例えば、15アミノ酸)である。

【0022】

ペプチドリinkerのアミノ酸配列としては、例えば、以下のような配列を挙げることができる。

Ser

Gly · Ser

Gly · Gly · Ser

Ser · Gly · Gly

Gly · Gly · Gly · Ser
 Ser · Gly · Gly · Gly
 Gly · Gly · Gly · Gly · Ser
 Ser · Gly · Gly · Gly · Gly
 Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Ser
 Ser · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly
 Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Ser
 Ser · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly
 (Gly · Gly · Gly · Gly · Ser)_n
 (Ser · Gly · Gly · Gly · Gly)_n

[nは1以上の整数である]等を挙げることができる。

【0023】

合成化学物リンカー（化学架橋剤）は、ペプチドの架橋に通常用いられている架橋剤、例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）ジスクシンイミジルスベレート（DSS）、ビス（スルホスクシンイミジル）スベレート（BS³）、ジチオビス（スクシンイミジルプロピオネート）（DSP）、ジチオビス（スルホスクシンイミジルプロピオネート）（DTSSP）、エチレングリコールビス（スクシンイミジルスクシネート）（EGS）、エチレングリコールビス（スルホスクシンイミジルスクシネート）（スルホ-EGS）、ジスクシンイミジル酒石酸塩（DST）、ジスルホスクシンイミジル酒石酸塩（スルホ-DST）、ビス[2-（スクシンイミドオキシカルボニルオキシ）エチル]スルホン（BSOCOES）、ビス[2-（スルホスクシンイミドオキシカルボニルオキシ）エチル]スルホン（スルホ-BSOCOES）などであり、これらの架橋剤は市販されている。

また本発明は、上記方法により活性が増強された抗体も提供する。

【0024】

また本発明は、以下の（a）～（d）に記載の工程を含む抗体の製造方法を提供する。

- （a） 2つ以上の抗体重鎖可変領域、2つ以上の抗体軽鎖可変領域、及び各可変領域を結合するペプチドリリンカーをコードするDNAを作製する工程、
- （b） 該DNAを含むベクターを作製する工程、
- （c） 該ベクターを宿主細胞に導入する工程、
- （d） 該宿主細胞を培養する工程

この方法においてはまず、2つ以上の抗体重鎖可変領域、2つ以上の抗体軽鎖可変領域、及び各可変領域を結合するペプチドリリンカーをコードするDNAを作製する。このようなDNAとしては、例えば2つの重鎖可変領域（VH）、2つの軽鎖可変領域（VL）、3つのペプチドリリンカーをコードしているDNAが挙げられ、好ましくはsc(Fv)₂が挙げられる。

【0025】

結合される2つのVHと2つのVLの順序は特に限定されず、どのような順序で並べられていてもよく、例えば、以下のような配置を挙げることができる。

[VH] リンカー [VL] リンカー [VH] リンカー [VL]
 [VL] リンカー [VH] リンカー [VH] リンカー [VL]
 [VH] リンカー [VL] リンカー [VL] リンカー [VH]
 [VH] リンカー [VH] リンカー [VL] リンカー [VL]
 [VL] リンカー [VL] リンカー [VH] リンカー [VH]
 [VL] リンカー [VH] リンカー [VL] リンカー [VH]

本発明においては、[VH] リンカー [VL] リンカー [VH] リンカー [VL] の配置が好ましい。

【0026】

重鎖可変領域又は軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、置換、欠失、付加及び／又は挿入されていてもよい。さらに、重鎖可変領域と軽鎖可変領域を会合させた場合に、抗原結合活性を有する限り、一部を欠損させてもよい。又、可変領域はキメラ化やヒト化されていてもよい。

【0027】

本方法においては次いで、上記DNAを含むベクターを作製する。

ベクターとしては、例えば、大腸菌を宿主とする場合には、ベクターを大腸菌（例えば、JM109、DH5 α 、HB101、XL1Blue）などで大量に増幅させ大量調製するために、大腸菌で増幅されるための「ori」をもち、さらに形質転換された大腸菌の選抜遺伝子（例えば、なんらかの薬剤（アンピシリンやテトラサイクリン、カナマイシン、クロラムフェニコール）により判別できるような薬剤耐性遺伝子）を有すれば特に制限はない。ベクターの例としては、M13系ベクター、pUC系ベクター、pBR322、pBluescript、pCR-Scriptなどが挙げられる。また、cDNAのサブクローニング、切り出しを目的とした場合、上記ベクターの他に、例えば、pGEM-T、pDIRECT、pT7などが挙げられる。

【0028】

本発明のベクターとしては、特に、発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、例えば、大腸菌での発現を目的とした場合は、ベクターが大腸菌で増幅されるような上記特徴を持つほかに、宿主をJM109、DH5 α 、HB101、XL1-Blueなどの大腸菌とした場合には、大腸菌で効率よく発現できるようなプロモーター、例えば、lacZプロモーター（Wardら、Nature (1989) 341, 544-546; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427）、araBプロモーター（Betterら、Science (1988) 240, 1041-1043）、またはT7プロモーターなどを持っていることが不可欠である。このようなベクターとしては、上記ベクターの他にpGEX-5X-1（ファルマシア社製）、「QIAexpress system」（キアゲン社製）、pEGFP、またはpET（この場合、宿主はT7 RNAポリメラーゼを発現しているBL21が好ましい）などが挙げられる。

【0029】

また、ベクターには、ポリペプチド分泌のためのシグナル配列が含まれていてもよい。タンパク質分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelBシグナル配列（Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379）を使用すればよい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法を用いて行うことができる。

【0030】

大腸菌以外にも、例えば、本発明のベクターとしては、哺乳動物由来の発現ベクター（例えば、pcDNA3（インビトロゲン社製）や、pEGF-BOS（Nucleic Acids. Res.1990, 18(17), p5322）、pEF、pCDM8）、昆虫細胞由来の発現ベクター（例えば「Bac-to-BAC baculovirus expression system」（ギブコBRL社製）、pBacPAK8）、植物由来の発現ベクター（例えばpMH1、pMH2）、動物ウイルス由来の発現ベクター（例えば、pHSV、pMV、pAdexLcw）、レトロウイルス由来の発現ベクター（例えば、pZIPneo）、酵母由来の発現ベクター（例えば、「Pichia Expression Kit」（インビトロゲン社製）、pNV11、SP-Q01）、枯草菌由来の発現ベクター（例えば、pPL608、pKTH50）が挙げられる。

【0031】

CHO細胞、COS細胞、NIH3T3細胞等の動物細胞での発現を目的とした場合には、細胞内で発現させるために必要なプロモーター、例えばSV40プロモーター（Mulliganら、Nature (1979) 277, 108）、MMTV-LTRプロモーター、EF1 α プロモーター（Mizushimaら、Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322）、CMVプロモーターなどを持っていることが不可欠であり、細胞への形質転換を選抜するための遺伝子（例えば、薬剤（ネオマイシン、G418など）により判別できるような薬剤耐性遺伝子）を有すればさらに好ましい。このような特性を有するベクターとしては、例えば、pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、pOP13などが挙げられる。

【0032】

さらに、遺伝子を安定的に発現させ、かつ、細胞内での遺伝子のコピー数の増幅を目的とする場合には、核酸合成経路を欠損したCHO細胞にそれを相補するDHFR遺伝子を有するベクター（例えば、pCHOIなど）を導入し、メトトレキセート（MTX）により増幅させる方法が挙げられ、また、遺伝子の一過性の発現を目的とする場合には、SV40 T抗原を発現す

る遺伝子を染色体上に持つCOS細胞を用いてSV40の複製起点を持つベクター（pcDなど）で形質転換する方法が挙げられる。複製開始点としては、また、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ウシパピローマウイルス（BPV）等の由来のものを用いることもできる。さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ（APH）遺伝子、チミジンキナーゼ（TK）遺伝子、大腸菌キサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（Ecogpt）遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素（dhfr）遺伝子等を含むことができる。

【0033】

本方法においては次いで、該ベクターを宿主細胞に導入する。ベクターが導入される宿主細胞としては特に制限はなく、例えば、大腸菌や種々の動物細胞などを用いることが可能である。宿主細胞は、例えば、本発明の2つ以上の抗体重鎖可変領域、2つ以上の抗体軽鎖可変領域、及び各可変領域を結合するペプチドリンカーからなるポリペプチドの製造や発現のための産生系として使用することができる。ポリペプチド製造のための産生系は、in vitroおよびin vivoの産生系がある。in vitroの産生系としては、真核細胞を使用する産生系や原核細胞を使用する産生系が挙げられる。

【0034】

真核細胞を使用する場合、例えば、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を宿主に用いることができる。動物細胞としては、哺乳類細胞、例えば、CHO（J. Exp. Med. (1995) 108, 945）、COS、3T3、ミエローマ、BHK（baby hamster kidney）、HeLa、Vero、両生類細胞、例えばアフリカツメガエル卵母細胞（Valle, et al., Nature (1981) 291, 358-340）、あるいは昆虫細胞、例えば、Sf9、Sf21、Tn5が知られている。本発明においては、CHO-DG44、CHO-DXB11、COS7細胞、BHKが好適に用いられる。動物細胞において、大量発現を目的とする場合には特にCHO細胞が好ましい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、カチオニックリボソームDOTAP（ベーリンガー・マンハイム社製）を用いた方法、エレクトロポレーション法、リポフェクションなどの方法で行うことが可能である。

【0035】

植物細胞としては、例えば、ニコチアナ・タバカム（*Nicotiana tabacum*）由来の細胞がタンパク質生産系として知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス（*Saccharomyces*）属、例えば、サッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）、サッカロミセス・ポンベ（*Saccharomyces pombe*）、糸状菌、例えば、アスペルギルス（*Aspergillus*）属、例えば、アスペルギルス・ニガー（*Aspergillus niger*）が知られている。

原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌（*E. coli*）、例えば、JM109、DH5 α 、HB101等が挙げられ、その他、枯草菌が知られている。

【0036】

本方法においては次いで上記宿主細胞を培養する。目的とするDNAにより形質転換された細胞をin vitroで培養することにより、抗体が得られる。培養は、公知の方法に従い行うことができる。例えば、動物細胞の培養液として、例えば、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDMを使用することができる。その際、FBS、牛胎児血清（FCS）等の血清補液を併用することもできるし、無血清培養してもよい。培養時のpHは、約6~8であるのが好ましい。培養は、通常、約30~40℃で約15~200時間行い、必要に応じて培地の交換、通気、攪拌を加える。

【0037】

一方、in vivoでポリペプチドを産生させる系としては、例えば、動物を使用する産生系や植物を使用する産生系が挙げられる。これらの動物又は植物に目的とするDNAを導入し、動物又は植物の体内でポリペプチドを産生させ、回収する。本発明における「宿主」とは、これらの動物、植物を包含する。

【0038】

動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる産生系がある。哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシを用いることができる (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993)。また、哺乳類動物を用いる場合、トランスジェニック動物を用いることができる。

【0039】

例えば、目的とするDNAを、ヤギ β カゼインのような乳汁中に固有に産生されるポリペプチドをコードする遺伝子との融合遺伝子として調製する。次いで、この融合遺伝子を含むDNA断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ移植する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギ又はその子孫が産生する乳汁から、目的のタンパク質を得ることができる。トランスジェニックヤギから産生されるタンパク質を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい (Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702)。

【0040】

また、昆虫としては、例えばカイコを用いることができる。カイコを用いる場合、目的のタンパク質をコードするDNAを挿入したバキュロウイルスをカイコに感染させることにより、このカイコの体液から目的の抗体を得ることができる (Susumu, M. et al., Nature (1985) 315, 592-594)。

【0041】

さらに、植物を使用する場合、例えばタバコを用いることができる。タバコを用いる場合、目的とする抗体をコードするDNAを植物発現用ベクター、例えばpMON 530に挿入し、このベクターをアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) のようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えば、ニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) に感染させ、本タバコの葉より所望の抗体を得ることができる (Julian K.-C. Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138)。

【0042】

これにより得られた抗体は、宿主細胞内または細胞外 (培地など) から単離し、実質的に純粋で均一な抗体として精製することができる。抗体の分離、精製は、通常のポリペプチドの精製で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、クロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動法、透析、再結晶等を適宜選択、組み合わせれば抗体を分離、精製することができる。

【0043】

クロマトグラフィーとしては、例えばアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996)。これらのクロマトグラフィーは、液相クロマトグラフィー、例えばHPLC、FPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテインAカラム、プロテインGカラムが挙げられる。例えば、プロテインAを用いたカラムとして、Hyper D, POROS, Sepharose F. F. (Pharmacia)等が挙げられる。

【0044】

なお、抗体の精製前又は精製後に適当なタンパク質修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり部分的にペプチドを除去することもできる。タンパク質修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、リシルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グルコシダーゼなどが用いられる。

【0045】

本発明において増強される抗体の活性は、結合活性、中和活性、細胞傷害活性、アゴニスト活性、アンタゴニスト活性、酵素活性など、いかなる活性でもよく特に限定されないが、生体、組織、細胞、タンパク質、DNA、RNA等に量的及び／又は質的な変化、影響をも

たらず活性であることが好ましく、特にアゴニスト活性が好ましい。

【0046】

アゴニスト活性とは、受容体などの抗原に抗体が結合することにより、細胞内にシグナルが伝達される等して、何らかの生理的活性の変化を誘導する活性である。生理的活性としては、例えば、増殖活性、生存活性、分化活性、転写活性、膜輸送活性、結合活性、タンパク質分解活性、リン酸化／脱リン酸化活性、酸化還元活性、転移活性、核酸分解活性、脱水活性、細胞死誘導活性、アポトーシス誘導活性、などを挙げることができるが、これらに限定されるわけではない。

【0047】

本発明において抗原は特に限定されず、どのような抗原でもよい。抗原の例としては、例えば、受容体、癌抗原、MHC抗原、分化抗原、などを挙げることができる。

【0048】

受容体の例としては、例えば、造血因子受容体ファミリー、サイトカイン受容体ファミリー、チロシンキナーゼ型受容体ファミリー、セリン／スレオニンキナーゼ型受容体ファミリー、TNF受容体ファミリー、Gタンパク質共役型受容体ファミリー、GPIアンカー型受容体ファミリー、チロシンホスファターゼ型受容体ファミリー、接着因子ファミリー、ホルモン受容体ファミリー、等の受容体ファミリーに属する受容体などを挙げることができる。これら受容体ファミリーに属する受容体、及びその特徴に関しては多数の文献が存在し、例えば、Cooke BA., King RJB., van der Molen HJ. ed. *New Comprehensive Biochemistry Vol.18B "Hormones and their Actions Part II"* pp.1-46 (1988) Elsevier Science Publishers BV., New York, USA、Patthy L. (1990) *Cell*, 61: 13-14., Ullrich A., et al. (1990) *Cell*, 61: 203-212., Massagui J. (1992) *Cell*, 69: 1067-1070., Miyajima A., et al. (1992) *Annu. Rev. Immunol.*, 10: 295-331., Taga T. and Kishimoto T. (1992) *FASEB J.*, 7: 3387-3396., Fantl WJ., et al. (1993) *Annu. Rev. Biochem.*, 62: 453-481., Smith CA., et al. (1994) *Cell*, 76: 959-962., Flower DR. (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, 1422: 207-234., 宮坂昌之監修, 細胞工学別冊ハンドブックシリーズ「接着因子ハンドブック」(1994) (秀潤社, 東京, 日本) 等が挙げられる。

【0049】

上記受容体ファミリーに属する具体的な受容体としては、例えば、ヒト又はマウスエリスロポエチン(EPO)受容体、ヒト又はマウス顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)受容体、ヒト又はマウスストロンボポイエチン(TPO)受容体、ヒト又はマウスインスリン受容体、ヒト又はマウスFlt-3リガンド受容体、ヒト又はマウス血小板由来増殖因子(PDGF)受容体、ヒト又はマウスインターフェロン(IFN)- α 、 β 受容体、ヒト又はマウスレプチン受容体、ヒト又はマウス成長ホルモン(GH)受容体、ヒト又はマウスインターロイキン(IL)-10受容体、ヒト又はマウスインスリン様増殖因子(IGF)-I受容体、ヒト又はマウス白血病抑制因子(LIF)受容体、ヒト又はマウス毛様体神経栄養因子(CNTF)受容体等を例示することができる(hEPOR: Simon, S. et al. (1990) *Blood* 76, 31-35.; mEPOR: D'Andrea, AD. Et al. (1989) *Cell* 57, 277-285.; hG-CSFR: Fukunaga, R. et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 87, 8702-8706.; mG-CSFR: Fukunaga, R. et al. (1990) *Cell* 61, 341-350.; hTPOR: Vigon, I. et al. (1992) 89, 5640-5644.; mTPOR: Skoda, RC. Et al. (1993) 12, 2645-2653.; hInsR: Ullrich, A. et al. (1985) *Nature* 313, 756-761.; hFlt-3: Small, D. et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91, 459-463.; hPDGFR: Gronwald, RGK. Et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85, 3435-3439.; hIFN α / β R: Uze, G. et al. (1990) *Cell* 60, 225-234. 及び Novick, D. et al. (1994) *Cell* 77, 391-400.)。

【0050】

癌抗原は細胞の悪性化に伴って発現する抗原であり、腫瘍特異性抗原とも呼ばれる。又、細胞が癌化した際に細胞表面やタンパク質分子上に現れる異常な糖鎖も癌抗原となり、特に癌糖鎖抗原と呼ばれる。癌抗原の例としては、例えば、CA19-9、CA15-3、シリアルSS EA-1(SLX)などを挙げることができる。

【 0 0 5 1 】

MHC抗原には、MHC class I抗原とMHC class II抗原に大別され、MHC class I抗原には、HLA-A, -B, -C, -E, -F, -G, -Hが含まれ、MHC class II抗原には、HLA-DR, -DQ, -DPが含まれる。

分化抗原には、CD1, CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15s, CD16, CD18, CD19, CD20, CD21, CD23, CD25, CD28, CD29, CD30, CD32, CD33, CD34, CD35, CD38, CD40, CD41a, CD41b, CD42a, CD42b, CD43, CD44, CD45, CD45RO, CD48, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD51, CD54, CD55, CD56, CD57, CD58, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD64, CD69, CD71, CD73, CD95, CD102, CD106, CD122, CD126, CDw130などが含まれる。

【 0 0 5 2 】

活性の変化を測定する為に用いる検出指標としては、量的及び／又は質的な変化が測定可能である限り使用することができる。例えば、無細胞系(cell free assay)の指標、細胞系(cell-based assay)の指標、組織系の指標、生体系の指標を用いることができる。

【 0 0 5 3 】

無細胞系の指標としては、酵素反応やタンパク質、DNA、RNAの量的及び／又は質的な変化を用いることができる。酵素反応としては、例えば、アミノ酸転移反応、糖転移反応、脱水反応、脱水素反応、基質切断反応等を用いることができる。また、タンパク質のリン酸化、脱リン酸化、二量化、多量化、分解、乖離等や、DNA、RNAの増幅、切断、伸長を用いることができる。例えばシグナル伝達経路の下流に存在するタンパク質のリン酸化を検出指標とすることができる。

【 0 0 5 4 】

細胞系の指標としては、細胞の表現型の変化、例えば、産生物質の量的及び／又は質的な変化、増殖活性の変化、細胞数の変化、形態の変化、特性の変化等を用いることができる。産生物質としては、分泌タンパク質、表面抗原、細胞内タンパク質、mRNA等を用いることができる。形態の変化としては、突起形成及び／又は突起の数の変化、扁平度の変化、伸長度／縦横比の変化、細胞の大きさの変化、内部構造の変化、細胞集団としての異形性／均一性、細胞密度の変化等を用いることができる。これらの形態の変化は検鏡下での観察で確認することができる。特性の変化としては、足場依存性、サイトカイン依存応答性、ホルモン依存性、薬剤耐性、細胞運動性、細胞遊走活性、拍動性、細胞内物質の変化等を用いることができる。細胞運動性としては、細胞浸潤活性、細胞遊走活性がある。また、細胞内物質の変化としては例えば、酵素活性、mRNA量、 Ca^{2+} やcAMP等の細胞内情報伝達物質、細胞内タンパク質量等を用いることができる。また、細胞膜受容体の場合には、受容体の刺激によって誘導される細胞の増殖活性の変化を指標とすることができる。

【 0 0 5 5 】

組織系の指標としては、使用する組織に応じた機能変化を検出指標とすることができる。生体系の指標としては組織重量変化、血液系の変化、例えば血球細胞数の変化、タンパク質量や、酵素活性、電解質量の変化、また、循環器系の変化、例えば、血圧、心拍数の変化等を用いることができる。

【 0 0 5 6 】

これらの検出指標を測定する方法としては、特に制限はなく、吸光、発光、発色、蛍光、放射活性、蛍光偏光度、表面プラズモン共鳴シグナル、時間分解蛍光度、質量、吸収スペクトル、光散乱、蛍光共鳴エネルギー移動、等を用いることができる。これらの測定方法は当業者にとっては周知であり、目的に応じて、適宜選択することができる。

【 0 0 5 7 】

例えば、吸収スペクトルは一般的に用いられるフォトメータやプレートリーダー等、発光はルミノメータ等、蛍光はフルオロメータ等で測定することができる。質量は質量分析計を用いて測定することができる。放射活性は、放射線の種類に応じてガンマカウンターなどの測定機器を用いて、蛍光偏光度はBEACON（宝酒造）、表面プラズモン共鳴シグナルはBIACORE、時間分解蛍光、蛍光共鳴エネルギー移動などはARVOなどにより測定できる。さらに、フローサイトメータなども測定に用いることができる。これらの測定方法は、一つ

の測定方法で2種以上の検出指標を測定しても良く、簡便であれば、2種以上の測定を同時及び／又は連続して測定することによりさらに多数の検出指標を測定することも可能である。例えば、蛍光と蛍光共鳴エネルギー移動を同時にフルオロメータで測定することができる。

【0058】

本発明において、アゴニスト活性の測定は当業者に公知の方法により行うことが可能である。例えば、実施例に記載のように細胞増殖を指標にアゴニスト活性を測定する方法により判定することが可能である。より具体的には、アゴニスト依存性増殖を示す細胞に、アゴニスト活性を測定したい抗体を添加し、培養する。その後、WST-8のような生細胞数に応じて特定の波長において発色反応を呈する試薬を添加して吸光度を測定し、得られた吸光度を指標にアゴニスト活性を測定することが可能である。

【0059】

アゴニスト依存性増殖を示す細胞も当業者に公知の方法により作製することが可能であり、例えば、抗原が細胞増殖シグナルを発する受容体である場合には、該受容体を発現している細胞を用いればよい。又、抗原が細胞増殖シグナルを出さない受容体である場合には、細胞増殖シグナルを発する受容体の細胞内領域と、細胞増殖シグナルを出さない受容体の細胞外領域からなるキメラ受容体を作製し、該キメラ受容体を細胞で発現させればよい。細胞増殖シグナルを発する受容体の例としては、例えば、G-CSF受容体、mpl、neu、GM-CSF受容体、EPO受容体、c-kit、FLT-3等を挙げることができる。受容体を発現させる細胞としては、例えば、BaF3、NFS60、FDCP-1、FDCP-2、CTLL-2、DA-1、KT-3等を挙げることができる。

【実施例】

【0060】

以下、実施例に基づいて本発明を更に具体的に説明する。

【0061】

【実施例1】 抗ヒトMpl抗体の作製

1.1 Mpl発現BaF3細胞株の樹立

TP0依存増殖性細胞株を得るために、全長Mpl遺伝子を発現するBaF3細胞株の樹立を行った。全長ヒトMpl cDNA (Palaciosら、Cell 1985; 41: 727-734) (GenBank#NM_005373)をPCRにより増幅し、pCHOI (Hirataら、FEBS Letter 1994; 356: 244-248)のDHFR遺伝子発現部位を除去し、HEF-VH-g γ 1 (Satoら、Mol Immunol. 1994; 31: 371-381)のNeomycin耐性遺伝子発現部位を挿入した発現ベクターpCOS2にクローニングし、pCOS2-hMplfullを構築した。また、カニクイザル骨髄細胞から抽出したTotal RNAからSMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech社製)を用いて、カニクイザルMpl cDNA (配列番号: 1、該塩基配列によってコードされるタンパク質のアミノ酸配列を配列番号: 2)をクローニングした。得られたカニクイザルcDNAをpCOS2に挿入し、pCOS2-monkeyMplfullを構築した。

【0062】

作製した各ベクター(20 μ g)をPBSに懸濁したBaF3細胞(1 \times 10⁷ cells/mL)に混合し、Gene Pulser キュベットに加え、Gene Pulser II (Bio-Rad社製)を用いて0.33kV, 950 μ FDの容量でパルスを加えた。エレクトロポレーション処理により遺伝子導入したBaF3細胞を1ng/mL マウスインターロイキン3 (以下、mIL-3、Peprotech社製)、500 μ g/mL Geneticin (Invitrogen社製)、10% FBS (Invitrogen社製)を含むRPMI1640培地 (Invitrogen社製)に加えて選抜し、ヒトMpl発現BaF3細胞株 (以下、BaF3-human Mpl) およびサルMpl発現BaF3細胞株 (以下、BaF3-monkey Mpl) を樹立した。選抜後は、1ng/mL rhTP0 (R&D社製)、10% FBSを含むRPMI1640培地を用いて培養、維持した。

【0063】

1.2 Mpl発現CHO細胞株の樹立

Flow Cytometryを用いた結合活性評価用の細胞株を得るために、全長Mpl遺伝子を発現するCHO細胞株の樹立を行った。はじめに、pCXN2 (Niwaら、Gene 1991; 108: 193-199)のHindIII部位にpCHOIのDHFR遺伝子発現部位を挿入して、発現ベクターpCXND3を作製した。

pCOS2-hMplfull、pCOS2-monkeyMplfullを鋳型にして、His-tag配列を含むPrimerを用いてPCRにより増幅した各Mpl遺伝子をpCXND3にクローニングし、pCXND3-hMpl-HisおよびpCXND3-monkey Mpl-Hisを構築した。

【0064】

作製した各ベクター(25 μ g)をPBSに懸濁したCHO-DG44細胞(1×10^7 cells/mL)に混合し、Gene Pulserキュベットに加え、Gene Pulser II (Bio-Rad社製)を用いて1.5kV, 25 μ FDの容量でパルスを加えた。エレクトロポレーション処理により遺伝子導入したCHO細胞を500 μ g/mL Geneticin、1xHT (Invitrogen社製)を含むCHO-S-SFMII培地(Invitrogen社製)に加えて選抜し、ヒトMpl発現CHO細胞株(以下、CHO-human Mpl)およびサルMpl発現CHO細胞株(以下、CHO-monkey Mpl)を樹立した。

【0065】

1.3 可溶型ヒトMplタンパク質の調製

可溶型ヒトMplタンパク質を調製するため、昆虫細胞Sf9細胞で分泌産生する発現系を以下のように構築した。ヒトMplの細胞外領域(Gln26からTrp491)の下流にFLAGタグを付加した遺伝子を作製し、pBACSurf-1 Transfer Plasmid (Novagen社製)のPstI-SmaI部位に挿入し、pBACSurf1-hMpl-FLAGを作製した。続いて、Bac-N-Blue Transfection Kit (Invitrogen)を用いて、4 μ gのpBACSurf1-hMpl-FLAGをSf9細胞に導入した。培養3日後に培養上清を回収し、プラークアッセイにより組換えウイルスを単離した。ウイルスストックを調製後にSf9細胞に感染させて培養上清を回収した。

【0066】

得られた培養上清を用いて、以下のように可溶型ヒトMplタンパク質を精製した。培養上清をQ Sepharose Fast Flow (Amersham Biosciences社製)に吸着させた後に、50mM Na-Phosphate Buffer, 0.01%(v/v) Tween20, 500mM NaCl (pH 7.2)を用いて溶出した。溶出液をFLAG M2 -Agarose (SIGMA-ALDRICH社製)に吸着させた後に、100mM Glycine-HCl, 0.01%(v/v) Tween20 (pH 3.5)を用いて溶出した。溶出後、直ちに1M Tris-Cl (pH8.0)により中和し、PD-10 column (Amersham Biosciences社製)を用いて、PBS(-), 0.01% (v/v) Tween20に置換を行った。精製した可溶型Mplタンパク質をshMpl-FLAGと称する。

【0067】

1.4 ヒトMpl-IgG Fc融合タンパク質の調製

ヒトMpl-IgG Fc融合タンパク質遺伝子はBennettらの方法(Bennettら、J.Biol.Chem. 1991; 266: 23060-23067)に従って作製した。ヒトMplの細胞外領域(Gln26からTrp491)をコードする塩基配列をヒトIgG- γ 1のFc領域(Asp216よりの下流の領域)をコードする塩基配列に連結し、連結部にFusion LinkerとしてBstEII配列(アミノ酸Val-Thr)を付加した。シグナル配列は、ヒトIgG H鎖可変領域のシグナルペプチド19アミノ酸を使用した。得られたヒトMpl-IgG Fc融合タンパク質遺伝子をpCXND3にクローニングし、pCXND3-hMpl-Fcを構築した。

【0068】

作製した各ベクター(25 μ g)をPBSに懸濁したCHO-DG44細胞(1×10^7 cells/mL)に混合し、Gene Pulser キュベットに加え、Gene Pulser II (Bio-Rad社製)を用いて1.5kV, 25 μ FDの容量でパルスを加えた。エレクトロポレーション処理により遺伝子導入したCHO細胞を500 μ g/mL Geneticin、1xHTを含むCHO-S-SFMII培地に加えて選抜し、shMPL-Fc発現CHO細胞株(CHO-hMpl-Fc)を樹立した。

【0069】

得られた培養上清を用いて、以下のようにヒトMpl-IgG Fc融合タンパク質を精製した。培養上清をQ Sepharose Fast Flow (Amersham Biosciences社製)に吸着させた後に、50mM Na-Phosphate Buffer, 0.01%(v/v) Tween20, 1M NaCl (pH 7.6)を用いて溶出した。溶出液をHiTrap proteinG HPカラム (Amersham Biosciences社製)に吸着させた後に、0.1 M Glycine-HCl, 150 mM NaCl, 0.01%(v/v) Tween20 (pH 2.7)を用いて溶出した。溶出後、直ちに1M Tris-Cl (pH8.0)により中和し、PD-10 column (Amersham Biosciences社製)を用いて、PBS(-), 0.01% (v/v) Tween20に置換を行った。精製した可溶型Mplタンパク質を

hMpl-Fcと称する。

【0070】

1.5 shMpl-FLAGおよびBaF-human Mplの免疫、ハイブリドーマの選抜

MRL/MpJUmCrj-lpr/lprマウス（以下、MRL/lprマウス、日本チャールス・リバーより購入）を用いて、8週令より免疫を開始した。初回免疫は100 μ g/匹のshMPL-FLAGにフロイント完全アジュバント（H37 Ra、ベクトン・ディッキンソン社製）を加え、エマルジョン化したものを皮下に投与した。追加免疫は50 μ g/匹のshMPL-FLAGにフロイント不完全アジュバント（ベクトン・ディッキンソン社製）を加え、エマルジョン化したものを皮下に投与した合計6回免疫を行ったマウス3匹に対し、50 μ g/匹のshMPL-FLAGを尾静脈内投与することにより最終免疫を行った。マウスミエローマ細胞P3-X63Ag8U1（P3U1、ATCCより購入）とマウス脾臓細胞を混合し、Polyethylene Glycol 1500（Roche Diagnostics社製）を加えながら混合することにより細胞融合を行った。翌日よりHAT培地を用いて選抜を行い、培養上清を用いてshMpl-FLAGまたはhMpl-Fcを固相化したイムノプレートを用いたELISAおよびBaF3-hMplを用いた細胞増殖活性を指標としたスクリーニングを実施した。陽性クローンについて、限界希釈法によりモノクローン化した後に、拡大培養を行い、培養上清を回収した。この方法により、抗ヒトMpl抗体を産生するハイブリドーマVB22B, VB16, VB140, VB45Bを取得した。

【0071】

一方で、BaF-human MplをBalb/Cマウス（日本チャールス・リバーより購入）に 1×10^7 細胞を1週間から5ヶ月の間隔で腹腔内に合計11回投与したマウスのマウス脾臓細胞をマウスミエローマ細胞P3U1と上述と同様に細胞融合を行った。翌日よりHAT培地を用いて選抜を行い、培養上清を用いてBaF3-hMplを用いた細胞増殖活性を指標としたスクリーニングを実施した。陽性クローンについて、限界希釈法によりモノクローン化した後に、拡大培養を行い、培養上清を回収した。この方法により、抗ヒトMpl抗体を産生するハイブリドーマTA136を取得した。

【0072】

1.6 抗ヒトMpl抗体の解析

抗体濃度はヤギ抗マウス IgG (gamma) (ZYMED社製)とアルカリフォスファターゼ-ヤギ抗マウス IgG (gamma) (ZYMED社製)を用いたマウスIgGサンドイッチELISAを行い、アイソタイプの等しい市販抗体をスタンダードにして、GraphPad Prism (GraphPad Software, USA)を用いて検量線を作成し、抗体濃度の換算を行った。

【0073】

抗体のアイソタイプは、アイソタイプ特異的な二次抗体を用いた抗原依存的ELISAにて決定した。hMpl-Fcを1 μ g/mLとなるようにcoating buffer (0.1mM NaHCO₃ (pH9.6), 0.02% (w/v) NaN₃)で希釈したものをに加え、4℃にて一晩反応し、コーティングした。Diluent buffer (50mM Tris-HCl (pH8.1), 1mM MgCl₂, 150mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween20, 0.02% (w/v) NaN₃, 1% (w/v) BSA)にてブロッキング処理を行った後、ハイブリドーマの培養上清を加え、室温で1時間放置した。Rinse buffer (0.05% (v/v) Tween20, PBS)にて洗浄した後、Alkaline phosphatase標識したアイソタイプ特異的な二次抗体を加え、室温で1時間放置した。発色はSIGMA104 (SIGMA-ALDRICH社製)を1mg/mLとなるようにSubstrate Buffer (50mM NaHCO₃ (pH9.8), 10mM MgCl₂)に希釈したものをを用い、405nmの吸光度をBenchmark Plus (Bio-Rad社製)にて測定した。

【0074】

shMpl-FLAGおよびhMPL-Fcに対する結合活性は、ELISAにより評価した。精製したshMpl-FLAGおよびhMPL-Fcを1 μ g/mLになるようにコーティングし、Diluent bufferにてブロッキング処理を行った。ハイブリドーマの培養上清を加え、室温で1時間放置した後、Alkaline Phosphatase標識した抗マウスIgG抗体 (Zymed社製)を加え、上記方法と同様に発色を行った。室温で1時間発色させた後に405nmの吸光度を測定し、GraphPad Prismを用いてEC₅₀値を算出した。

【0075】

CHO-human MplまたはCHO-monkey Mplを回収し、 1×10^6 cells/mLになるようにFACS Buffer (1% FBS/ PBS)に懸濁した。 $100 \mu\text{L}/\text{well}$ となるようにMultiscreen (Millipore社製)に分注し、遠心操作にて培養上清を除去した。 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ になるように希釈した培養上清を加え、氷上にて30分間反応させた。細胞をFACS bufferにて1回洗浄し、FITC標識抗マウスIgG抗体 (Beckman Coulter社製) を添加し、氷上にて30分間反応させた。反応後、500rpmで1分間遠心し、上清を除き、FACS Buffer $400 \mu\text{L}$ に懸濁し、EPICS ELITE ESP (Beckman Coulter)を用いてフローサイトメトリーを行った。前方散乱光 (forward scatter) 及び側方散乱光 (side scatter) のヒストグラムにて生細胞集団にゲートを設定した。

【0076】

抗体のアゴニスト活性は、TPO依存性増殖を示すBaF3-human MplまたはBaF3-monkey Mplを用いて評価した。各細胞をそれぞれ 4×10^5 cells/mLとなるように10% Fetal Bovine Serum (Invitrogen社製)を含むRPMI1640 (Invitrogen社製)に懸濁し、 $60 \mu\text{L}/\text{well}$ で96well plateに分注した。rhTPO (R&D社製)およびハイブリドーマ培養上清の濃度を振り、各wellに $40 \mu\text{L}$ 加え、 37°C 、5% CO_2 条件下で、24時間培養した。 $10 \mu\text{L}/\text{well}$ でCell Count Reagent SF (ナカライテスク社製)を加え、2時間培養後に、450 nmの吸光度(対照655nm)をBenchmark Plusにて測定し、GraphPad Prismを用いて EC_{50} 値を算出した。

【0077】

以上に示す解析により、ヒトMplに結合する抗体VB22B, VB16, VB140, VB45B, TA136を取得した。

【0078】

1.7 抗ヒトMpl抗体の精製

ハイブリドーマの培養上清を用いて、以下のように抗ヒトMpl抗体を精製した。培養上清をHiTrap proteinG HPカラム (Amersham Biosciences社製)に吸着させた後に、0.1 M Glycine-HCl (pH 2.7)を用いて溶出した。溶出後、直ちに1M Tris-Cl (pH9.0)により直ちに中和し、PBSで一昼夜透析を行い、バッファー置換を行った。

【0079】

〔実施例2〕 抗ヒトMpl一本鎖抗体の作製

以下に抗ヒトMpl抗体VB22Bの一本鎖抗体作製例について示す。

2.1 抗ヒトMpl抗体可変領域のクローニング

抗ヒトMpl抗体を産生するハイブリドーマより抽出したTotal RNAを用いて、RT-PCR法によって増幅した。Total RNAは、RNeasy Plant Mini Kits (QIAGEN社製)を用いて 1×10^7 細胞のハイブリドーマより抽出した。

【0080】

$1 \mu\text{g}$ のTotal RNAを使用して、SMART RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH社製)を用いて、マウスIgG2b定常領域配列に相補的な合成オリゴヌクレオチドMHC-IgG2b (配列番号: 3) またはマウス κ 鎖定常領域塩基配列に相補的な合成オリゴヌクレオチドkappa (配列番号: 4)を用いて、5'末端側遺伝子断片を増幅した。逆転写反応は 42°C で1時間30分間反応させた。

PCR反応溶液($50 \mu\text{L}$)の組成を次に示す。

- 5 μL の10×Advantage 2 PCR Buffer、
- 5 μL の10×Universal Primer A Mix、
- 0.2mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) 、
- 1 μL のAdvantage 2 Polymerase Mix

(以上の成分はいずれもCLONTECH社製)

2.5 μL の逆転写反応産物、

10pmoleの合成オリゴヌクレオチドMHC-IgG2bまたはkappa

また反応温度条件は次のとおりである。

94°C の初期温度にて30秒間、

$94^\circ\text{C}/5$ 秒間、 $72^\circ\text{C}/3$ 分間のサイクルを5回反復

$94^\circ\text{C}/5$ 秒間、 $70^\circ\text{C}/10$ 秒間、 $72^\circ\text{C}/3$ 分間のサイクルを5回反復、

94℃/5秒間、68℃/10秒間、72℃/3分間のサイクルを25回反復
最後に反応産物を72℃で7分間加熱した。

【 0 0 8 1 】

PCR産物はQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて、アガロースゲルから精製した後、pGEM-T Easyベクター (Promega社製) へクローニングした。さらに、ABI 3700 DNA Analyzer (Perkin Elmer社製) を用いて塩基配列を決定した。クローニングしたVB22B H鎖可変領域 (以下、VB22B-VH) の塩基配列を配列番号：5 に、該塩基配列によってコードされるタンパク質のアミノ酸配列を配列番号：6 に、L鎖可変領域 (以下、VB22B-VL) の塩基配列を配列番号：7 に、該塩基配列によってコードされるタンパク質のアミノ酸配列を配列番号：8 に示す。また、VB22B, VB16, VB140, VB45B, TA136のアミノ酸配列を図1に示す。

【 0 0 8 2 】

2.2 抗ヒトMpl抗体Diabody発現ベクターの作製

5アミノ酸からなるリンカー配列を用いたVB22B一本鎖Fv (以下、VB22B Diabody) をコードする遺伝子は、VB22B-VHをコードする遺伝子の3'末端およびVB22B-VLをコードする遺伝子の5'末端に (Gly₄Ser)₁ から成るリンカーをコードする塩基配列を付加させた遺伝子について、それぞれPCR法を用いて増幅し、連結することにより構築した。

【 0 0 8 3 】

VB22B-VHの前方プライマー70・115HF (配列番号：9) は、EcoRI部位を有するように設計し、VB22B-VHの後方プライマー33・115HR (配列番号：10) は、VB22B-VHのC末端をコードするDNAにハイブリダイズし、かつ (Gly₄Ser)₁ から成るリンカーをコードする塩基配列ならびにVB22B-VLのN末端をコードするDNAにハイブリダイズする塩基配列を有するように設計した。VB22B-VLの前方プライマー33・115LF (配列番号：11) は、VB22B-VLのN末端をコードする塩基配列ならびに (Gly₄Ser)₁ から成るリンカーをコードする塩基配列、VB22B-VHのC末端をコードする塩基配列を有するように設計した。VB22B-VLの後方プライマー33・115LR (配列番号：12) は、VB22B-VLのC末端をコードするDNAにハイブリダイズし、かつFLAGタグ (AspTyrLysAspAsp AspAspLys / 配列番号：13) をコードする塩基配列を有し、さらにNotI部位を有するように設計した。

【 0 0 8 4 】

第一PCRにおいて、VB22B-VHおよびリンカー配列とVB22B-VLおよびリンカー配列を含む2つのPCR反応物を以下のように合成した。

PCR反応溶液 (50 μ L) の組成を次に示す。

5 μ Lの10×PCR Buffer、

0.4mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) 、

2.5ユニットのDNAポリメラーゼTaKaRa Ex Taq

(以上の成分はいずれも宝酒造社製) 、

10ngのVB22B-VHまたはVB22B-VL遺伝子を含むpGEM-T Easyベクター、

10pmoleの合成オリゴヌクレオチド70・115HF、33・115HRまたは33・115LF、33・115L

R

また反応温度条件は次のとおりである。

94℃の初期温度にて30秒間、

94℃/15秒間、72℃/2分間のサイクルを5回反復

94℃/15秒間、70℃/2分間のサイクルを5回反復、

94℃/15秒間、68℃/2分間のサイクルを28回反復

最後に反応産物を72℃で5分間加熱した。

【 0 0 8 5 】

約400bpのPCR産物をQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて、アガロースゲルから精製した後、各PCR産物の一部を用いて以下のように第二PCRを行った。

PCR反応溶液 (50 μ L) の組成を次に示す。

5 μ Lの10×PCR Buffer、

0.4mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、
2.5ユニットのDNAポリメラーゼTaKaRa Ex Taq
(以上の成分はいずれも宝酒造社製)、
1 μ Lの第一PCR産物 (2種類)、
10pmoleの合成オリゴヌクレオチド70・115HF、33・115LR
また反応温度条件は次のとおりである。

94℃の初期温度にて30秒間、
94℃/15秒間、72℃/2分間のサイクルを5回反復
94℃/15秒間、70℃/2分間のサイクルを5回反復、
94℃/15秒間、68℃/2分間のサイクルを28回反復
最後に反応産物を72℃で5分間加熱した。

【0086】

約800bpのPCR産物をQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて、アガロースゲルから精製した後、制限酵素EcoRI (宝酒造社製) および制限酵素NotI (宝酒造社製) で消化した後に、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN社製) を用いて精製し、pCXND3にクローニングし、pCXND3-VB22B dbを作製した。

【0087】

2.3 抗ヒトMpl抗体sc(Fv)2発現ベクターの作製

VB22B由来の2つのH鎖可変領域および2つのL鎖可変領域を含む改変抗体[sc(Fv)2]を発現するプラスミドを作製するために、前述のpCXND3-VB22B dbを用いて以下のようにPCR法により修飾した。sc(Fv)2遺伝子の構築過程について、図2に示した。

【0088】

はじめに、VB22B-VHをコードする遺伝子の3'末端およびVB22B-VLをコードする遺伝子の5'末端に15アミノ酸から成るリンカー (Gly₄Ser)₃をコードする塩基配列を付加させた遺伝子について、それぞれPCR法を用いて増幅し、連結することにより構築した。この構築過程において、3種類のプライマーを新たに設計した。VB22B-VHの前方プライマーVB22B-fpvu (プライマーA, 配列番号: 14) は、5'末端にEcoRI部位を有し、VB22B dbのGln22およびLeu23がPvuII部位に変換するように設計した。VB22B-VHの後方プライマーsc-rL15 (プライマーB, 配列番号: 15) は、VB22B-VHのC末端をコードするDNAにハイブリダイズし、かつ (Gly₄Ser)₃から成るリンカーをコードする塩基配列ならびにVB22B-VLのN末端をコードするDNAにハイブリダイズする塩基配列を有するように設計した。VB22B-VLの前方プライマーsc-fL15 (プライマーC, 配列番号: 16) は、VB22B-VLのN末端をコードする塩基配列ならびに (Gly₄Ser)₃から成るリンカーをコードする塩基配列、VB22B-VHのC末端をコードする塩基配列を有するように設計した。

【0089】

第一PCRにおいて、VB22B-VHおよびリンカー配列とVB22B-VLおよびリンカー配列を含む2つのPCR反応物を以下のように合成した。

PCR反応溶液 (50 μ L) の組成を次に示す。

5 μ Lの10×PCR Buffer、
0.4mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、
2.5ユニットのDNAポリメラーゼTaKaRa Ex Taq
(以上の成分はいずれも宝酒造社製)、

10ngのpCXND3-VB22B db、
10pmoleの合成オリゴヌクレオチドVB22B-fpvu、sc-rL15またはsc-fL15、
33・115LR (プライマーD)

また反応温度条件は次のとおりである。

94℃の初期温度にて30秒間、
94℃/15秒間、72℃/2分間のサイクルを5回反復
94℃/15秒間、70℃/2分間のサイクルを5回反復、
94℃/15秒間、68℃/2分間のサイクルを28回反復

最後に反応産物を72℃で5分間加熱した。

【0 0 9 0】

約400bpのPCR産物をQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて、アガロースゲルから精製した後、各PCR産物の一部を用いて以下のように第二PCRを行った。

PCR反応溶液(50 μ L)の組成を次に示す。

5 μ Lの10×PCR Buffer、
0.4mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、
2.5ユニットのDNAポリメラーゼTaKaRa Ex Taq
(以上の成分はいずれも宝酒造社製)、

1 μ Lの第一PCR産物 (2種類)、
10pmoleの合成オリゴヌクレオチド70・115HF、33・115LR
また反応温度条件は次のとおりである。

94℃の初期温度にて30秒間、
94℃/15秒間、72℃/2分間のサイクルを5回反復
94℃/15秒間、70℃/2分間のサイクルを5回反復、
94℃/15秒間、68℃/2分間のサイクルを28回反復
最後に反応産物を72℃で5分間加熱した。

【0 0 9 1】

約800bpのPCR産物をQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて、アガロースゲルから精製した後、制限酵素EcoRI (宝酒造社製) および制限酵素NotI (宝酒造社製) で消化した後に、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN社製) を用いて精製し、pBacPAK9 (CLONTECH社製) にクローニングし、pBacPAK9-scVB22Bを作製した。

【0 0 9 2】

次に、pBacPAK9-scVB22BのPvuII部位に挿入する断片を作製した。すなわちN末端が欠けたVB22B-VHとVB22B-VLを (Gly₄Ser)₃ から成るリンカーで連結したアミノ酸をコードする遺伝子をさらにVB22B-VHのN末端をコードする遺伝子と (Gly₄Ser)₃ から成るリンカーをコードする塩基配列で連結する断片で、両末端がPvuII認識配列となる断片である。2種類のプライマーを新たに設計し、PCR法を用いて、この断片を作製した。目的断片の前方プライマーFv2-f (プライマーE, 配列番号: 17) は、5'末端にPvuII部位を有し、VB22B-VHの5'末端側の配列を持つように設計した。目的断片の後方プライマーFv2-r (プライマーF, 配列番号: 18) は、VB22B-VLのC末端をコードするDNAにハイブリダイズし、かつ (Gly₄Ser)₃ から成るリンカーをコードする塩基配列ならびにVB22B-VHのN末端をコードするDNAにハイブリダイズする塩基配列、さらにPvuII部位を有するように設計した。pBacPAK9-scVB22Bを鋳型にして、以下のようにPCRを行った。

PCR反応溶液(50 μ L)の組成を次に示す。

5 μ Lの10×PCR Buffer、
0.4mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、
2.5ユニットのDNAポリメラーゼTaKaRa Ex Taq
(以上の成分はいずれも宝酒造社製)、

10 μ gのpBacPAK9-scVB22B、
10pmoleの合成オリゴヌクレオチドFv2-f、Fv2-r
また反応温度条件は次のとおりである。

94℃の初期温度にて30秒間、
94℃/15秒間、72℃/2分間のサイクルを5回反復
94℃/15秒間、70℃/2分間のサイクルを5回反復、
94℃/15秒間、68℃/2分間のサイクルを28回反復
最後に反応産物を72℃で5分間加熱した。

【0 0 9 3】

約800bpのPCR産物をQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて、アガロースゲルから精製した後、pGEM-T Easyベクター (Promega社製) へクローニングした。塩基

配列の決定後、制限酵素PvuII（宝酒造社製）で消化した後に、目的断片を回収した。pBacPAK9-scVB22Bを制限酵素PvuII（宝酒造社製）で消化した後に、回収した断片を連結し、pBacPAK9-VB22B sc(Fv)2を作製した。作製したベクターを制限酵素EcoRI（宝酒造社製）および制限酵素NotI（宝酒造社製）で消化した後に、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN社製）を用いて、約1800bpの断片をアガロースゲルから精製し、発現ベクターpCXND3にクローニングし、pCXND3-VB22B sc(Fv)2を作製した。

【 0 0 9 4 】

2.4 動物細胞を用いた抗ヒトMpl一本鎖抗体の発現

CHO-DG44細胞を用いた一本鎖抗体の安定発現細胞株の作製は次のようにして行った。Gene PulserII（BioRad社製）を用いたエレクトロポレーション法により遺伝子導入した。発現ベクター（25 μ g）とPBSに懸濁したCHO-DG44細胞（ 1×10^7 細胞/mL）の0.75mLを混合したものを氷上で10分間冷却し、キュベットに移した後に1.5kV、25 μ FDの容量にてパルスを与えた。室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、500 μ g/mL Geneticin（Invitrogen社製）を含むCHO-S-SFMII培地（Invitrogen社製）に加えて選抜し、発現CHO細胞株を樹立した。VB22B sc(Fv)2は、この方法で安定発現細胞株およびその培養上清を調製した。

【 0 0 9 5 】

COS7細胞を用いた一本鎖抗体の一過性発現は次のようにして行った。発現ベクター（10 μ g）とPBSに懸濁したCOS7細胞（ 1×10^7 細胞/mL）の0.75mLを混合したものを氷上で10分間冷却し、キュベットに移した後に1.5kV、25 μ FDの容量にてパルスを与えた。室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、10% FBSを含むDMEM培地（Invitrogen社製）に加え、一晚培養した後に、PBSで洗浄後にCHO-S-SFMII培地を加えて約3日間培養した。VB22B Diabodyは、この方法で培養上清を調製した。

【 0 0 9 6 】

2.5 培養上清中の抗ヒトMpl一本鎖抗体の定量

COS7細胞あるいはCHO細胞に一過性発現させた抗ヒトMpl一本鎖抗体の培養上清中の濃度は、表面プラズモン共鳴を利用して測定した。すなわちBIAcore2000（Biacore社製）にSensor Chip CM5（Biacore社製）をセットし、ANTI-FLAG M2 Monoclonal Antibody（SIGMA-ALDRICH社製）を結合した。流速5mL/secで適濃度のサンプルを流し、50mMジエチルアミンを流して結合した抗体を解離させた。サンプルを流したときの質量変化を測定し、標準品の質量変化に基づいて作成した検量線を用いて、濃度を算出した。Diabodyについての標準品は、db12E10（特願2001-27734参照）を使用し、sc(Fv)2についての標準品は同じ遺伝子構造を持つ12E10 sc(Fv)2を使用した。

【 0 0 9 7 】

2.6 抗ヒトMpl一本鎖抗体の精製

VB22B Diabody発現COS7細胞あるいはCHO細胞の培養上清を、50 mM Tris-HCl(pH7.4), 150 mM NaCl, 0.05% Tween20で平衡化したAnti-Flag M2 Affinity Gel（SIGMA-ALDRICH社製）カラムに吸着させ、100 mM Glycine-HCl(pH 3.5)で溶出させた。溶出画分は、直ちに1 M Tris-HCl (pH8.0)で中和を行い、HiLoad 26/60 Superdex200pg（Amersham-Bioscience社製）カラムを用いてゲルろ過クロマトグラフィーを行った。ゲルろ過クロマトグラフィーのバッファーは、PBS、0.01% Tween20を使用した。

【 0 0 9 8 】

VB22B sc(Fv)2発現COS7細胞あるいはCHO細胞の培養上清を、Diabody精製と同一条件で精製を行った。また、大量に調製する場合には、CHO細胞の培養上清を20mM リン酸緩衝液(pH6.8)で平衡化したMacro-Prep Ceramic Hydroxyapatite Type I（Bio-Rad社製）カラムにかけ、250mM リン酸緩衝液(pH6.8)で段階的に溶出した。溶出画分は、限外ろ過膜を用いて濃縮後、HiLoad 26/60 Superdex200pgカラムを用いてゲルろ過クロマトグラフィーを行い、分子量が約70kD~40kDに相当する画分を分取した。この画分を、50 mM Tris-HCl(pH7.4), 150 mM NaCl, 0.05% Tween20で平衡化したAnti-Flag M2 Affinity Gelカラムに吸着させ、100 mM Glycine-HCl(pH 3.5)で溶出させた。溶出画分は、直ちに1 M Tris-H

C1 (pH8.0)で中和を行い、HiLoad 26/60 Superdex200pgカラムを用いてゲルろ過クロマトグラフィーを行った。ゲルろ過クロマトグラフィーのバッファーは、20mM酢酸 (pH6.0), 150 mM NaCl, 0.01% Tween 80を使用した。

【0099】

2.7 抗ヒトMpl一本鎖抗体のTP0様アゴニスト活性の評価

TP0依存性増殖を示すBaF3-human Mplを用いてTP0用アゴニスト活性を評価した。各細胞を1% Fetal Bovine Serum(Invitrogen社製)を含むRPMI1640 (Invitrogen社製)で2回洗浄した後、 4×10^5 cells/mLとなるように10% Fetal Bovine Serumを含むRPMI1640に懸濁し、 $60 \mu\text{L}/\text{well}$ で96well plateに分注した。rhTP0 (R&D社製)、COS7培養上清または精製品の濃度を振り、各wellに $40 \mu\text{L}$ 加え、 37°C 、5% CO_2 条件下で、24時間培養した。 $10 \mu\text{L}/\text{well}$ でWST-8試薬 (Cell Count Reagent SF、ナカライテスク社製)を加え、直後にBenchmark Plusを用いて450 nmの吸光度(対照655nm)を測定し、2時間培養後に、再度450 nmの吸光度(対照655nm)を測定した。WST-8試薬は生細胞数に応じて450nmの発色反応を呈することから、2時間の吸光度変化を指標にTP0様アゴニスト活性を評価した。また、GraphPad Prismを用いて EC_{50} 値を算出した。

【0100】

精製したVB22B DiabodyおよびVB22B sc(Fv)2を用いて、BaF3-human Mpl, BaF3-monkey MplでのTP0様アゴニスト活性を評価した結果を図3、図4に示す。また、COS7でVB16, VB140, VB45B, TA136の一本鎖抗体 (Diabody, sc(Fv)2)を発現させ、培養上清を用いてBaF3-human MplでのTP0様アゴニスト活性を評価した結果をそれぞれ図5、図6、図7、図8に示す。さらに、これらの解析により得られた EC_{50} 値を表1に示す。

【0101】

【表1】

抗体名	BaF-human Mpl		BaF-monkey Mpl	
	Diabody	sc(Fv)2	Diabody	sc(Fv)2
VB22B	61	27	1668	26
VB16	190	95		
VB140	89	38		
VB45B	76	30		
TA136	3076	54		

各抗体を用いたBaF-human Mpl, BaF-monkey Mplのアゴニスト活性 (EC_{50} 値:pM)

【0102】

この結果より、Diabodyよりsc(Fv)2構造をもつ一本鎖抗体の方が、アゴニスト活性が高いことが確認された。アゴニスト活性は、抗原結合部位が二価であることが重要であるが、抗原結合部位間の距離や角度も重要な要素であると考えられる (特願2001-277314参照)。取得した抗体の認識するエピトープの違いにより、最適な距離や角度が異なることから、最適なリンカーの長さは、各抗体に依存すると考えられる。しかし、リンカーの長さが5~12merと短いときには、non-covalentなDiabodyを形成するが、リンカー長を長くする(12mer以上)ではDiabodyは形成されずにscFv一量体を形成することが報告されている (Hudson ら、J Immunol. Methods 1999; 231: 177-189)。よって、長いリンカーを使用しても二価の抗原結合部位が形成されるsc(Fv)2は、高いアゴニスト活性を有する可能性が高くなると推測される。また、non-covalentなDiabodyよりもリンカーで結合しているsc(Fv)2の方が安定性に優れていることから、高い活性を誘起できる可能性もある。

【図面の簡単な説明】

【0103】

【図1】 図1は、抗ヒトMpl抗体 (H鎖およびL鎖) のアミノ酸配列を示す図である。

図中に示したVB140 (H鎖) のアミノ酸配列を配列番号：19、VB45B (H鎖) のアミノ酸配列を配列番号：20、VB22B (H鎖) のアミノ酸配列を配列番号：21、VB16 (H鎖) のアミノ酸配列を配列番号：22、TA136 (H鎖) のアミノ酸配列を配列番号：23に示す。またVB140 (L鎖) のアミノ酸配列を配列番号：24、VB45B (L鎖) のアミノ酸配列を配列番号：25、VB22B (L鎖) のアミノ酸配列を配列番号：26、VB16 (L鎖) のアミノ酸配列を配列番号：27、TA136 (L鎖) のアミノ酸配列を配列番号：28に示す。

【図2】図2は、一本鎖抗体sc(Fv)2の作製過程を示す図である。

【図3】図3は、BaF-human Mplを用いたVB22B抗体のアゴニスト活性評価の結果を示すグラフである。

【図4】図4は、BaF-monkey Mplを用いたVB22B抗体のアゴニスト活性評価の結果を示すグラフである。

【図5】図5は、BaF-human Mplを用いたVB16抗体のアゴニスト活性評価の結果を示すグラフである。

【図6】図6は、BaF-human Mplを用いたVB140抗体のアゴニスト活性評価の結果を示すグラフである。

【図7】図7は、BaF-human Mplを用いたVB45B抗体のアゴニスト活性評価の結果を示すグラフである。

【図8】図8は、BaF-human Mplを用いたTA136抗体のアゴニスト活性評価の結果を示すグラフである。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> Methods for enhancing activity of antibody.

<130> C1-A0321

<160> 28

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1924

<212> DNA

<213> Macaca fascicularis

<220>

<221> CDS

<222> (11)..(1918)

<223>

<400> 1

gaattccacc	atg	ccc	tcc	tgg	gcc	ctc	ttc	atg	gtc	acc	tcc	tgc	ctc	49
	Met	Pro	Ser	Trp	Ala	Leu	Phe	Met	Val	Thr	Ser	Cys	Leu	
	1			5					10					

ctc	ctg	gcc	cct	caa	aac	ctg	gcc	caa	gtc	agc	agc	caa	gat	gtc	tcc	97
Leu	Leu	Ala	Pro	Gln	Asn	Leu	Ala	Gln	Val	Ser	Ser	Gln	Asp	Val	Ser	
15						20					25					

ttg	ctg	gcc	tcg	gac	tca	gag	ccc	ctg	aag	tgt	ttc	tcc	cga	aca	ttt	145
Leu	Leu	Ala	Ser	Asp	Ser	Glu	Pro	Leu	Lys	Cys	Phe	Ser	Arg	Thr	Phe	
30				35					40					45		

gag	gac	ctc	act	tgc	ttc	tgg	gat	gag	gaa	gag	gca	gca	ccc	agt	ggg	193
Glu	Asp	Leu	Thr	Cys	Phe	Trp	Asp	Glu	Glu	Glu	Ala	Ala	Pro	Ser	Gly	
				50				55						60		

aca	tac	cag	ctg	ctg	tat	gcc	tac	ccg	ggg	gag	aag	ccc	cgt	gcc	tgc	241
Thr	Tyr	Gln	Leu	Leu	Tyr	Ala	Tyr	Pro	Gly	Glu	Lys	Pro	Arg	Ala	Cys	
		65					70					75				

ccc	ctg	agt	tct	cag	agc	gtg	ccc	cgc	ttt	gga	acc	cga	tac	gtg	tgc	289
Pro	Leu	Ser	Ser	Gln	Ser	Val	Pro	Arg	Phe	Gly	Thr	Arg	Tyr	Val	Cys	
	80					85						90				

cag	ttt	cca	gcc	cag	gaa	gaa	gtg	cgt	ctc	ttc	tct	ccg	ctg	cac	ctc	337
Gln	Phe	Pro	Ala	Gln	Glu	Glu	Val	Arg	Leu	Phe	Ser	Pro	Leu	His	Leu	

95

100

105

tgg gtg aag aat gtg ttc cta aac cag act cag att cag cga gtc ctc 385
Trp Val Lys Asn Val Phe Leu Asn Gln Thr Gln Ile Gln Arg Val Leu
110 115 120 125

ttt gtg gac agt gta ggc ctg ccg gct ccc ccc agt atc atc aag gcc 433
Phe Val Asp Ser Val Gly Leu Pro Ala Pro Pro Ser Ile Ile Lys Ala
130 135 140

atg ggt ggg agc cag cca ggg gaa ctt cag atc agc tgg gag gcc cca 481
Met Gly Gly Ser Gln Pro Gly Glu Leu Gln Ile Ser Trp Glu Ala Pro
145 150 155

gct cca gaa atc agt gat ttc ctg agg tac gaa ctc cgc tat ggc ccc 529
Ala Pro Glu Ile Ser Asp Phe Leu Arg Tyr Glu Leu Arg Tyr Gly Pro
160 165 170

aaa gat ctc aag aac tcc act ggt ccc acg gtc ata cag ttg atc gcc 577
Lys Asp Leu Lys Asn Ser Thr Gly Pro Thr Val Ile Gln Leu Ile Ala
175 180 185

aca gaa acc tgc tgc cct gct ctg cag agg cca cac tca gcc tct gct 625
Thr Glu Thr Cys Cys Pro Ala Leu Gln Arg Pro His Ser Ala Ser Ala
190 195 200 205

ctg gac cag tct cca tgt gct cag ccc aca atg ccc tgg caa gat gga 673
Leu Asp Gln Ser Pro Cys Ala Gln Pro Thr Met Pro Trp Gln Asp Gly
210 215 220

cca aag cag acc tcc cca act aga gaa gct tca gct ctg aca gca gtg 721
Pro Lys Gln Thr Ser Pro Thr Arg Glu Ala Ser Ala Leu Thr Ala Val
225 230 235

ggt gga agc tgc ctc atc tca gga ctc cag cct ggc aac tcc tac tgg 769
Gly Gly Ser Cys Leu Ile Ser Gly Leu Gln Pro Gly Asn Ser Tyr Trp
240 245 250

ctg cag ctg cgc agc gaa cct gat ggg atc tcc ctc ggt ggc tcc tgg 817
Leu Gln Leu Arg Ser Glu Pro Asp Gly Ile Ser Leu Gly Gly Ser Trp
255 260 265

gga tcc tgg tcc ctc cct gtg act gtg gac ctg cct gga gat gca gtg 865
Gly Ser Trp Ser Leu Pro Val Thr Val Asp Leu Pro Gly Asp Ala Val
270 275 280 285

gca att gga ctg caa tgc ttt acc ttg gac ctg aag aat gtt acc tgt 913
Ala Ile Gly Leu Gln Cys Phe Thr Leu Asp Leu Lys Asn Val Thr Cys
290 295 300

caa tgg cag caa gag gac cat gct agt tcc caa ggt ttc ttc tac cac 961
 Gln Trp Gln Gln Glu Asp His Ala Ser Ser Gln Gly Phe Phe Tyr His
 305 310 315

agc agg gca cgg tgc tgc ccc aga gac agg tac ccc atc tgg gag gac 1009
 Ser Arg Ala Arg Cys Cys Pro Arg Asp Arg Tyr Pro Ile Trp Glu Asp
 320 325 330

tgt gaa gag gaa gag aaa aca aat cca gga tta cag acc cca cag ttc 1057
 Cys Glu Glu Glu Glu Lys Thr Asn Pro Gly Leu Gln Thr Pro Gln Phe
 335 340 345

tct cgc tgc cac ttc aag tca cga aat gac agc gtt att cac atc ctt 1105
 Ser Arg Cys His Phe Lys Ser Arg Asn Asp Ser Val Ile His Ile Leu
 350 355 360 365

gtg gag gtg acc aca gcc ctg ggt gct gtt cac agt tac ctg ggc tcc 1153
 Val Glu Val Thr Thr Ala Leu Gly Ala Val His Ser Tyr Leu Gly Ser
 370 375 380

cct ttc tgg atc cac cag gct gtg cgc ctc ccc acc cca aac ttg cac 1201
 Pro Phe Trp Ile His Gln Ala Val Arg Leu Pro Thr Pro Asn Leu His
 385 390 395

tgg agg gag atc tcc agc ggg cat ctg gaa ttg gag tgg cag cac cca 1249
 Trp Arg Glu Ile Ser Ser Gly His Leu Glu Leu Glu Trp Gln His Pro
 400 405 410

tca tcc tgg gca gcc caa gag acc tgc tat caa ctc cga tac aca gga 1297
 Ser Ser Trp Ala Ala Gln Glu Thr Cys Tyr Gln Leu Arg Tyr Thr Gly
 415 420 425

gaa ggc cat cag gac tgg aag gtg ctg gag ccg cct ctc ggg gcc cga 1345
 Glu Gly His Gln Asp Trp Lys Val Leu Glu Pro Pro Leu Gly Ala Arg
 430 435 440 445

gga ggg acc ctg gag ctg cgc ccg cga tct cgc tac cgt tta cag ctg 1393
 Gly Gly Thr Leu Glu Leu Arg Pro Arg Ser Arg Tyr Arg Leu Gln Leu
 450 455 460

cgc gcc agg ctc aat ggc ccc acc tac caa ggt ccc tgg agc tcg tgg 1441
 Arg Ala Arg Leu Asn Gly Pro Thr Tyr Gln Gly Pro Trp Ser Ser Trp
 465 470 475

tcg gac cca gct agg gtg gag acc gcc acc gag acc gcc tgg att tcc 1489
 Ser Asp Pro Ala Arg Val Glu Thr Ala Thr Glu Thr Ala Trp Ile Ser
 480 485 490

ttg gtg acc gct ctg ctg cta gtg ctg ggc ctc agc gcc gtc ctg ggc 1537
 Leu Val Thr Ala Leu Leu Leu Val Leu Gly Leu Ser Ala Val Leu Gly

495

500

505

ctg ctg ctg ctg agg tgg cag ttt cct gca cac tac agg aga ctg agg 1585
Leu Leu Leu Leu Arg Trp Gln Phe Pro Ala His Tyr Arg Arg Leu Arg
510 515 520 525

cat gcc ctg tgg ccc tca ctt cca gat ctg cac cga gtc cta ggc cag 1633
His Ala Leu Trp Pro Ser Leu Pro Asp Leu His Arg Val Leu Gly Gln
530 535 540

tac ctt agg gac act gca gcc ctg agt ccg ccc aag gcc aca gtc tca 1681
Tyr Leu Arg Asp Thr Ala Ala Leu Ser Pro Pro Lys Ala Thr Val Ser
545 550 555

gat acc tgt gaa gaa gtg gaa ccc agc ctc ctt gaa atc ctc ccc aag 1729
Asp Thr Cys Glu Glu Val Glu Pro Ser Leu Leu Glu Ile Leu Pro Lys
560 565 570

tcc tca gag agg act cct ttg ccc ctg tgt tcc tcc cag tcc cag atg 1777
Ser Ser Glu Arg Thr Pro Leu Pro Leu Cys Ser Ser Gln Ser Gln Met
575 580 585

gac tac cga aga ttg cag cct tct tgc ctg ggg acc atg ccc ctg tct 1825
Asp Tyr Arg Arg Leu Gln Pro Ser Cys Leu Gly Thr Met Pro Leu Ser
590 595 600 605

gtg tgc cca ccc atg gct gag tca ggg tcc tgc tgt acc acc cac att 1873
Val Cys Pro Pro Met Ala Glu Ser Gly Ser Cys Cys Thr Thr His Ile
610 615 620

gcc aac cat tcc tac cta cca cta agc tat tgg cag cag cct tga 1918
Ala Asn His Ser Tyr Leu Pro Leu Ser Tyr Trp Gln Gln Pro
625 630 635

gtcgcac 1924

<210> 2

<211> 635

<212> PRT

<213> Macaca fascicularis

<400> 2

Met Pro Ser Trp Ala Leu Phe Met Val Thr Ser Cys Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15

Pro Gln Asn Leu Ala Gln Val Ser Ser Gln Asp Val Ser Leu Leu Ala
20 25 30

Ser Asp Ser Glu Pro Leu Lys Cys Phe Ser Arg Thr Phe Glu Asp Leu
35 40 45

Thr Cys Phe Trp Asp Glu Glu Glu Ala Ala Pro Ser Gly Thr Tyr Gln
50 55 60

Leu Leu Tyr Ala Tyr Pro Gly Glu Lys Pro Arg Ala Cys Pro Leu Ser
65 70 75 80

Ser Gln Ser Val Pro Arg Phe Gly Thr Arg Tyr Val Cys Gln Phe Pro
85 90 95

Ala Gln Glu Glu Val Arg Leu Phe Ser Pro Leu His Leu Trp Val Lys
100 105 110

Asn Val Phe Leu Asn Gln Thr Gln Ile Gln Arg Val Leu Phe Val Asp
115 120 125

Ser Val Gly Leu Pro Ala Pro Pro Ser Ile Ile Lys Ala Met Gly Gly
130 135 140

Ser Gln Pro Gly Glu Leu Gln Ile Ser Trp Glu Ala Pro Ala Pro Glu
145 150 155 160

Ile Ser Asp Phe Leu Arg Tyr Glu Leu Arg Tyr Gly Pro Lys Asp Leu
165 170 175

Lys Asn Ser Thr Gly Pro Thr Val Ile Gln Leu Ile Ala Thr Glu Thr
180 185 190

Cys Cys Pro Ala Leu Gln Arg Pro His Ser Ala Ser Ala Leu Asp Gln
195 200 205

Ser Pro Cys Ala Gln Pro Thr Met Pro Trp Gln Asp Gly Pro Lys Gln
210 215 220

Thr Ser Pro Thr Arg Glu Ala Ser Ala Leu Thr Ala Val Gly Gly Ser
225 230 235 240

Cys Leu Ile Ser Gly Leu Gln Pro Gly Asn Ser Tyr Trp Leu Gln Leu
245 250 255

Arg Ser Glu Pro Asp Gly Ile Ser Leu Gly Gly Ser Trp Gly Ser Trp
260 265 270

Ser Leu Pro Val Thr Val Asp Leu Pro Gly Asp Ala Val Ala Ile Gly
275 280 285

Leu Gln Cys Phe Thr Leu Asp Leu Lys Asn Val Thr Cys Gln Trp Gln
290 295 300

Gln Glu Asp His Ala Ser Ser Gln Gly Phe Phe Tyr His Ser Arg Ala

305 310 315 320
 Arg Cys Cys Pro Arg Asp Arg Tyr Pro Ile Trp Glu Asp Cys Glu Glu
 325 330 335
 Glu Glu Lys Thr Asn Pro Gly Leu Gln Thr Pro Gln Phe Ser Arg Cys
 340 345 350
 His Phe Lys Ser Arg Asn Asp Ser Val Ile His Ile Leu Val Glu Val
 355 360 365
 Thr Thr Ala Leu Gly Ala Val His Ser Tyr Leu Gly Ser Pro Phe Trp
 370 375 380
 Ile His Gln Ala Val Arg Leu Pro Thr Pro Asn Leu His Trp Arg Glu
 385 390 395 400
 Ile Ser Ser Gly His Leu Glu Leu Glu Trp Gln His Pro Ser Ser Trp
 405 410 415
 Ala Ala Gln Glu Thr Cys Tyr Gln Leu Arg Tyr Thr Gly Glu Gly His
 420 425 430
 Gln Asp Trp Lys Val Leu Glu Pro Pro Leu Gly Ala Arg Gly Gly Thr
 435 440 445
 Leu Glu Leu Arg Pro Arg Ser Arg Tyr Arg Leu Gln Leu Arg Ala Arg
 450 455 460
 Leu Asn Gly Pro Thr Tyr Gln Gly Pro Trp Ser Ser Trp Ser Asp Pro
 465 470 475 480
 Ala Arg Val Glu Thr Ala Thr Glu Thr Ala Trp Ile Ser Leu Val Thr
 485 490 495
 Ala Leu Leu Leu Val Leu Gly Leu Ser Ala Val Leu Gly Leu Leu Leu
 500 505 510
 Leu Arg Trp Gln Phe Pro Ala His Tyr Arg Arg Leu Arg His Ala Leu
 515 520 525
 Trp Pro Ser Leu Pro Asp Leu His Arg Val Leu Gly Gln Tyr Leu Arg
 530 535 540
 Asp Thr Ala Ala Leu Ser Pro Pro Lys Ala Thr Val Ser Asp Thr Cys
 545 550 555 560
 Glu Glu Val Glu Pro Ser Leu Leu Glu Ile Leu Pro Lys Ser Ser Glu
 565 570 575

Arg Thr Pro Leu Pro Leu Cys Ser Ser Gln Ser Gln Met Asp Tyr Arg
580 585 590

Arg Leu Gln Pro Ser Cys Leu Gly Thr Met Pro Leu Ser Val Cys Pro
595 600 605

Pro Met Ala Glu Ser Gly Ser Cys Cys Thr Thr His Ile Ala Asn His
610 615 620

Ser Tyr Leu Pro Leu Ser Tyr Trp Gln Gln Pro
625 630 635

<210> 3
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized sequence

<400> 3
caggggccag tggatagact gatg 24

<210> 4
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized sequence

<400> 4
gctcactgga tgggtgggaag atg 23

<210> 5
<211> 411
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(411)
<223>

<400> 5
atg gaa tgg cct ttg atc ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act gca ggt 48
Met Glu Trp Pro Leu Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
1 5 10 15

gtc cac tcc cag gtt cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gtg aag 96

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
20 25 30

cct ggg gcc tca gtg aag att tcc tgc aag gct tct ggc tat gca ttc 144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe
35 40 45

act aac tcc tgg atg aac tgg gtg aag cag agg cct gga aag ggt ctt 192
Thr Asn Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

gag tgg att gga cgg att tat cct gga gat gga gaa act atc tac aat 240
Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Asn
65 70 75 80

ggg aaa ttc agg gtc aag gcc aca ctg act gca gac aaa tcc tcc agc 288
Gly Lys Phe Arg Val Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95

aca gcc tac atg gat atc agc agc ctg aca tct gag gac tct gcg gtc 336
Thr Ala Tyr Met Asp Ile Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

tac ttc tgt gca aga ggc tat gat gat tac tcg ttt gct tac tgg ggc 384
Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Tyr Asp Asp Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly
115 120 125

caa ggg act ctg gtc act gtc tct gca 411
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
130 135

<210> 6
<211> 137
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 6
Met Glu Trp Pro Leu Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe
35 40 45

Thr Asn Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Asn

<400>	7																	
atg	agg	tgc	cta	gct	gag	ttc	ctg	ggg	ctg	ctt	gtg	ttc	tgg	att	cct			48
Met	Arg	Cys	Leu	Ala	Glu	Phe	Leu	Gly	Leu	Leu	Val	Phe	Trp	Ile	Pro			
1				5					10					15				
gga	gcc	att	ggg	gat	att	gtg	atg	act	cag	gct	gca	ccc	tct	ata	cct			96
Gly	Ala	Ile	Gly	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ala	Ala	Pro	Ser	Ile	Pro			
			20					25					30					
gtc	act	cct	gga	gag	tca	gta	tcc	atc	tcc	tgt	agg	tct	agt	aag	agt			144
Val	Thr	Pro	Gly	Glu	Ser	Val	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Lys	Ser			
		35					40					45						
ctc	ctg	cat	agt	aat	ggc	aac	act	tac	ttg	tat	tgg	ttc	ctg	cag	agg			192
Leu	Leu	His	Ser	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Trp	Phe	Leu	Gln	Arg			
	50					55					60							
cca	ggc	cag	tct	cct	caa	ctc	ctg	ata	tat	cgg	atg	tcc	aac	ctt	gcc			240
Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Met	Ser	Asn	Leu	Ala			
65					70					75					80			
tca	gga	gtc	cca	gat	agg	ttc	agt	ggc	agt	ggg	tca	gga	act	gct	ttc			288
Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ala	Phe			
				85					90					95				
aca	ctg	aga	atc	agt	aga	gtg	gag	gct	gag	gat	gtg	ggt	gtt	tat	tac			336

Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
100 105 110

tgt atg caa cat ata gaa tat cct ttt acg ttc gga tcg ggg acc aag 384
Cys Met Gln His Ile Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys
115 120 125

ctg gaa ata aaa 396
Leu Glu Ile Lys
130

<210> 8
<211> 132
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 8
Met Arg Cys Leu Ala Glu Phe Leu Gly Leu Leu Val Phe Trp Ile Pro
1 5 10 15

Gly Ala Ile Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Ile Pro
20 25 30

Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser
35 40 45

Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg
50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe
85 90 95

Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
100 105 110

Cys Met Gln His Ile Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Glu Ile Lys
130

<210> 9
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 9

tagaattcca ccatggaatg gcctttgatc

30

<210> 10

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 10

agcctgagtc atcacaatat ccgatccgcc tccacctgca gagacagtga ccagag

56

<210> 11

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 11

actctgggtca ctgtctctgc aggtggaggc ggatcggata ttgtgatgac tcaggc

56

<210> 12

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 12

attgcggccg cttatcactt atcgtcgtca tccttgtagt cttttatttc cagcttggtc

60

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized FLAG tag sequence

<400> 13

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1

5

<210> 14
<211> 85
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 14
tagaattcca ccatggaatg gcctttgatc tttctcttcc tcctgtcagg aactgcaggt 60
gtccactccc aggttcagct gcagc 85

<210> 15
<211> 82
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 15
tgagtcatca caatatccga tccgccacca cccgaaccac caccacccga accaccacca 60
cctgcagaga cagtgaccag ag 82

<210> 16
<211> 82
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 16
tggtcactgt ctctgcaggt ggtggtggtt cgggtggtgg tggttcgggt ggtggcggat 60
cggatattgt gatgactcag gc 82

<210> 17
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 17
caggttcagc tgcagcagtc tggac 25

<210> 18
 <211> 81
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 18
 gctgcagctg aacctgcgat ccaccgcctc ccgaaccacc accacccgat ccaccacctc 60
 cttttatttc cagcttggtc c 81

<210> 19
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 19
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Arg Ala Phe Gly Tyr Ala Phe Ser Asn Ser
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Glu Thr Asn Asn Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 20
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 20
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Arg Ala Phe Gly Tyr Ala Phe Ser Asn Ser
20 25 30
Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Glu Thr Asn Asn Asn Gly Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 21
<211> 118
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 21
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Ser
20 25 30
Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60
Arg Val Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Asp Ile Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Tyr Asp Asp Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 22
<211> 115
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 22
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Thr Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Trp Val Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile His Pro Tyr Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asn Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Ile Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Gly Gly Trp Phe Ala Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ala
115

<210> 23
<211> 116
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 23
Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
20 25 30

Tyr Ala Trp Ser Trp Ile Arg Gln Leu Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
35 40 45

Met Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Tyr Ser Ile Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Ile Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Leu Phe
65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Gly Gly Tyr Asp Asn Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 24
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 24
Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Ala Phe Thr Leu Arg Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 25
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 25
Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser

	20		25		30
Asn Gly	Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser				
35		40		45	
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro					
50		55		60	
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Ala Phe Thr Leu Arg Ile					
65		70		75	80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His					
	85		90		95
Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys					
	100		105		110

<210> 26
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 26
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Ile Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
 85 90 95

Ile Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 27
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 27

Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75 80

Ser Ser Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 28

<211> 108

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 28

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

His Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp
35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Met Glu
65 70 75 80

Thr Glu Asp Ala Ala Ser Tyr Phe Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

【書類名】 図面

【図 1】

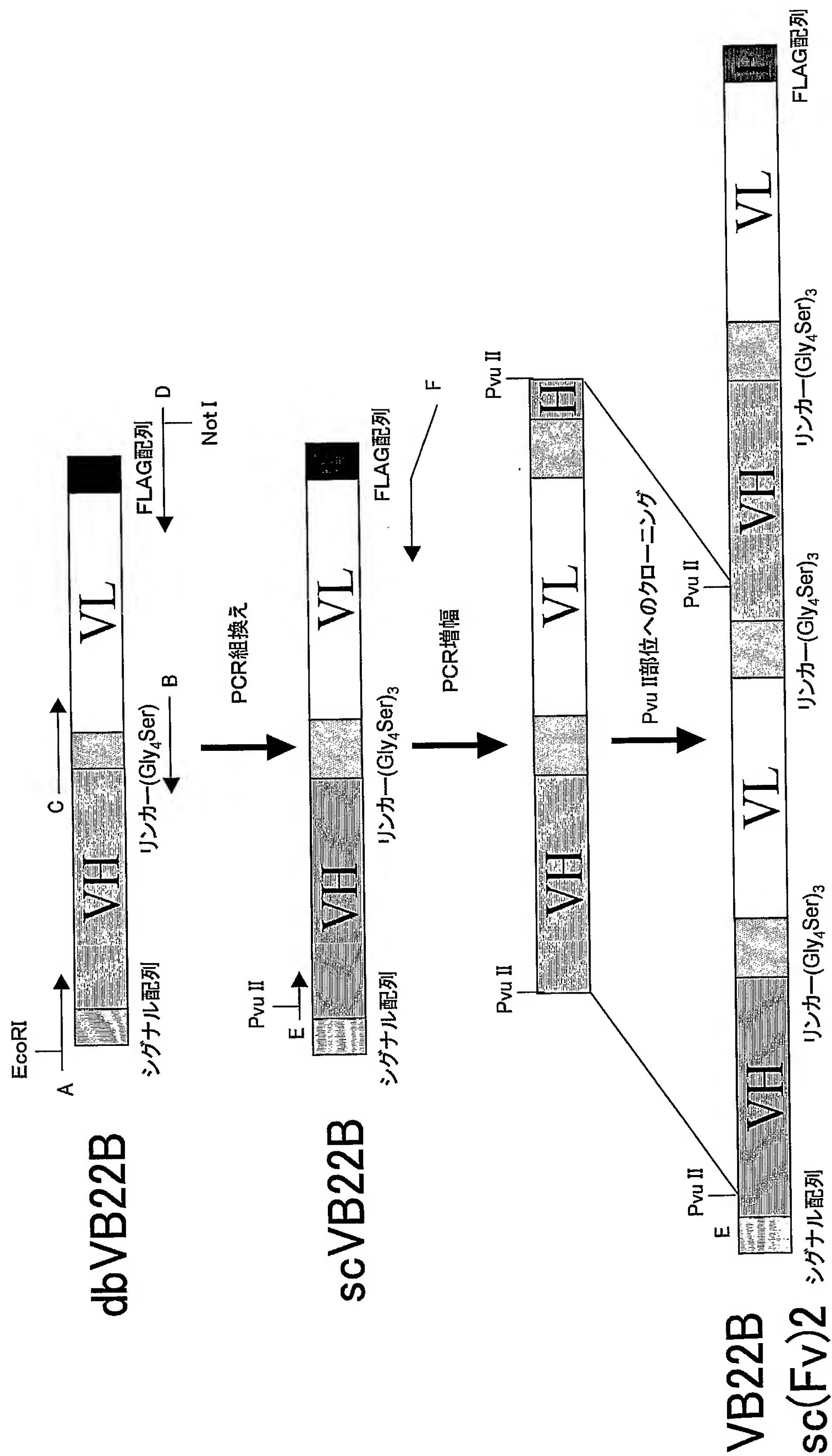
<H 鎖>

		CDR1		CDR2
VB140	QVQLQQSGPELVKPGASVKISCRAGYAFT	NSWMN	WVKQRPKGKLEWIG	RIYPGDGETNNNGKFKG
VB45B	QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFT	SSWMN	WVKQRPKGKLEWIG	RIYPGDGETNNNGKFKG
VB22B	QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFT	NSWMN	WVKQRPKGKLEWIG	RIYPGDGETIYNGKFRV
VB16	QVQLQQPGTELVRPGASVKLSCKASGYTFT	DYWVN	WVKQRPGRGLEWIG	RIHPYDSETHYNQKFKN
TA136	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSIT	SDYAWS	WIRQLPGNKLEWMG	YITYSGYSI-YNPSLKS
		CDR3		
VB140	KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAR	GYGD--YSFAY	WGQGLVTVSA	
VB45B	KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAR	GYGD--YSFAY	WGQGLVTVSA	
VB22B	KATLTADKSSSTAYMDISSLTSEDSAVYFCAR	GYDD--YSFAY	WGQGLVTVSA	
VB16	KATLTVDKSSSTAYIQLSSLTSEDSAVYYCAS	GGW-----FAS	WGQGLVTVSA	
TA136	RISISRDTSKNQLFLQLNSVTTEDTATYYCVG	GYDNMD----Y	WGQGTSVTVSS	

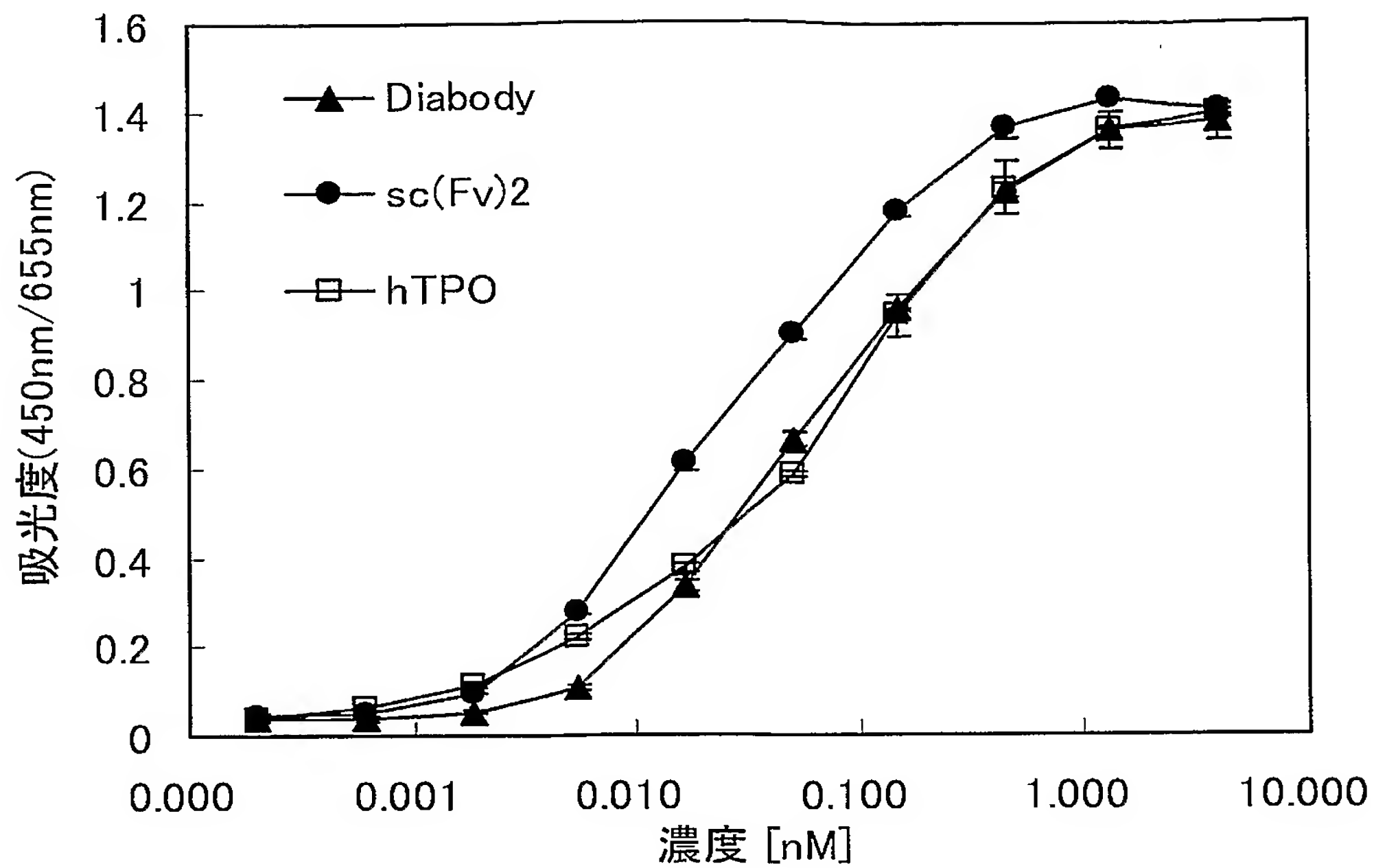
<L 鎖>

		CDR1		CDR2
VB140	DIVMTQAAPSVPVTPGESVSISC	RSSKSLHLSNGNTYLY	WFLQRPQGSPQLLIY	RMSNLAS
VB45B	DIVMTQAAPSVPVTPGESVSISC	RSSKSLHLSNGNTYLY	WFLQRPQGSPQLLIY	RMSNLAS
VB22B	DIVMTQAAPSVPVTPGESVSISC	RSSKSLHLSNGNTYLY	WFLQRPQGSPQLLIY	RMSNLAS
VB16	DIVMTQAAPSVPVTPGESVSISC	RSSKSLLYSNGNTYLY	WFLQRPQGSPQLLIY	RMSNLAS
TA136	QIVLTQSPAISASPGKVTLTCT	SASSSVSSH----LY	WYQOKPGSSPKLWIY	STSNLAS
		CDR3		
VB140	GVPDRFSGSGSGAAFTLRISRVEAEDVGVYYC	MQHLEYPYT	FGSGTKLEIK	
VB45B	GVPDRFSGSGSGAAFTLRISRVEAEDVGVYYC	MQHLEYPYT	FGSGTKLEIK	
VB22B	GVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYC	MQHLEYPYT	FGSGTKLEIK	
VB16	GVPDRFSGSGSGTAFTLTISSEVAEDVGVYYC	MQHLEYPYT	FGSGTKLEIK	
TA136	GVPARFSGSGSGTSYSLTISNMETEDAASYFC	HQWSSYPWT	FGGGTKLEIK	

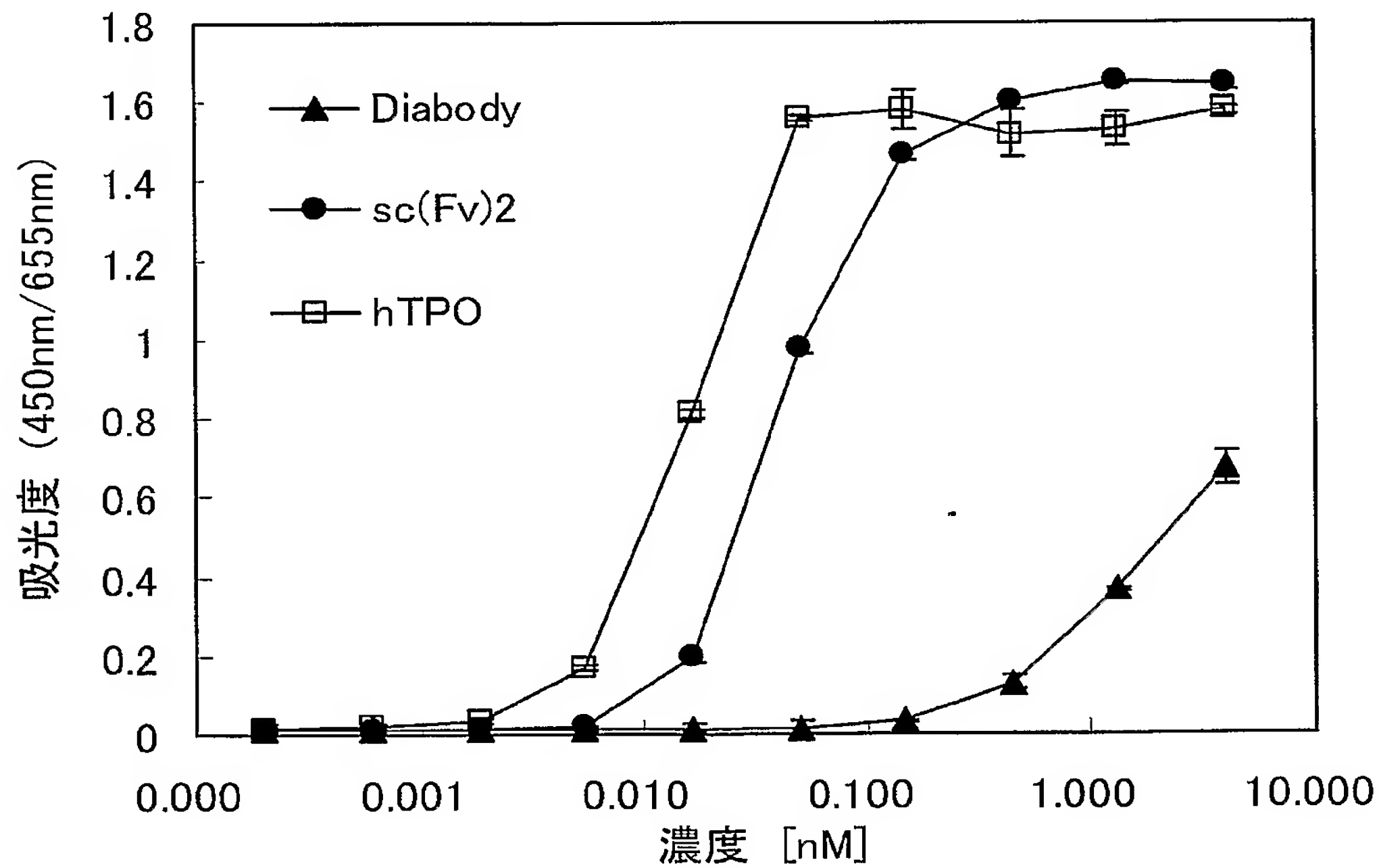
【図 2】



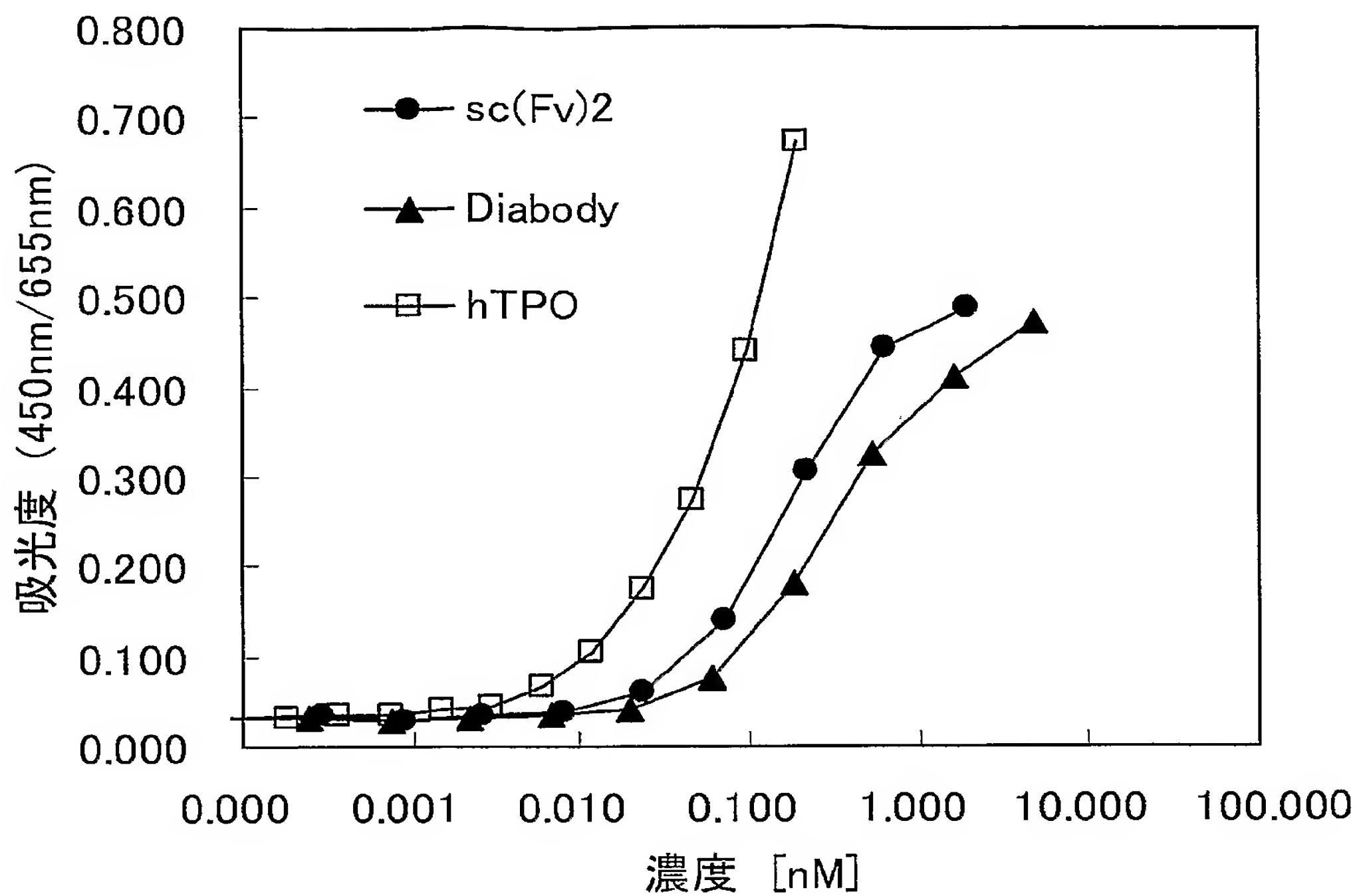
【図 3】



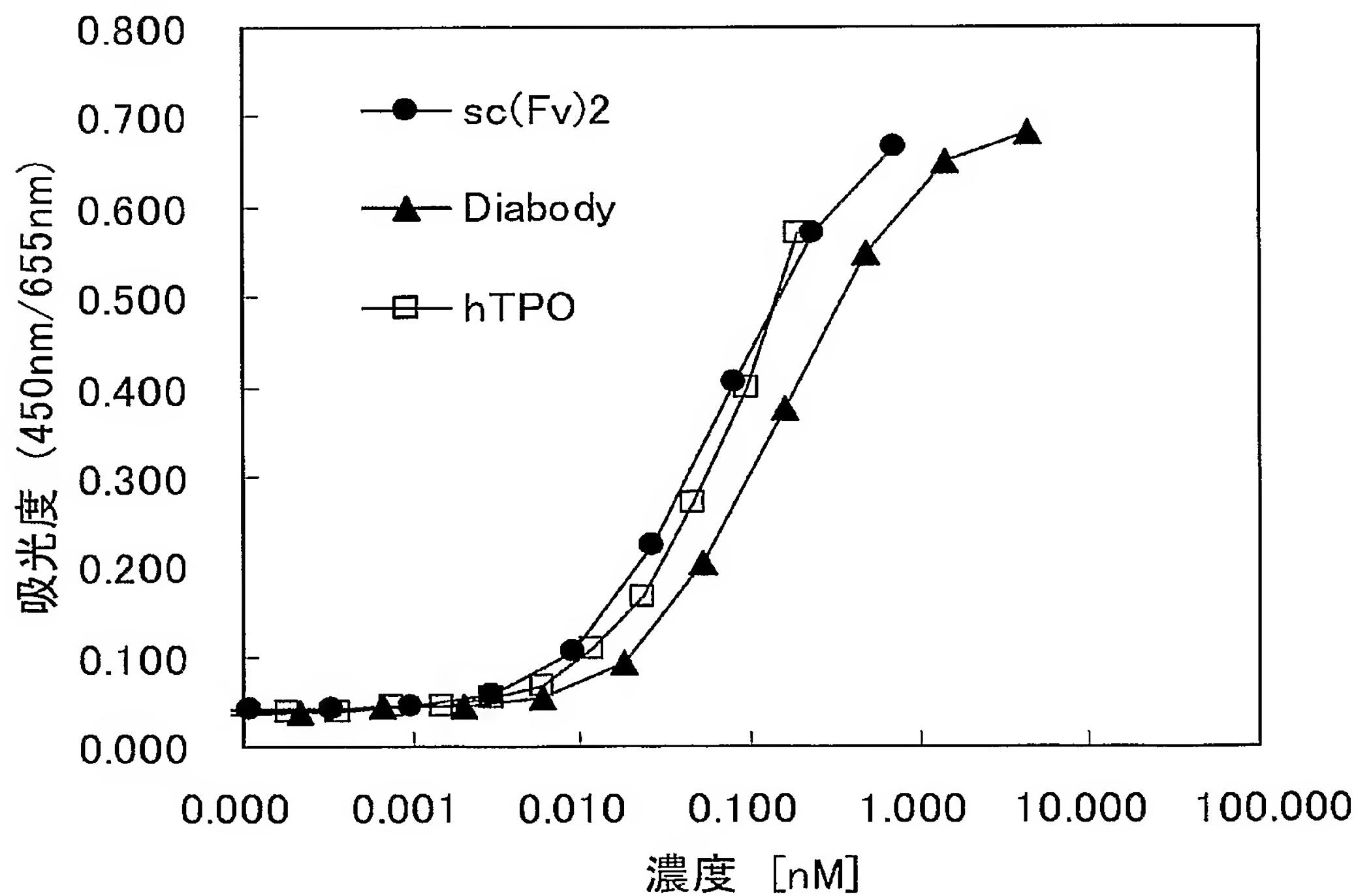
【図 4】



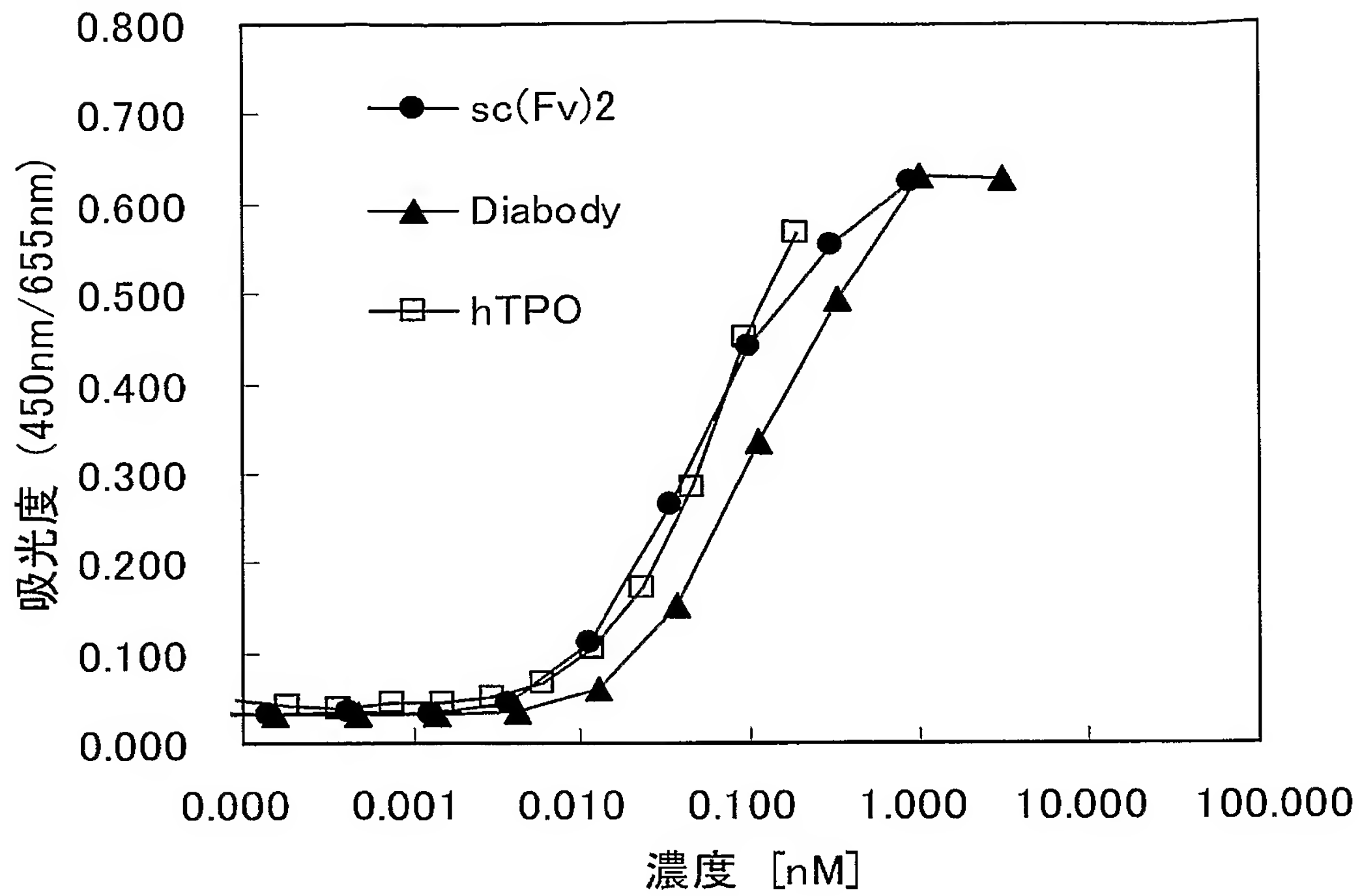
【図 5】



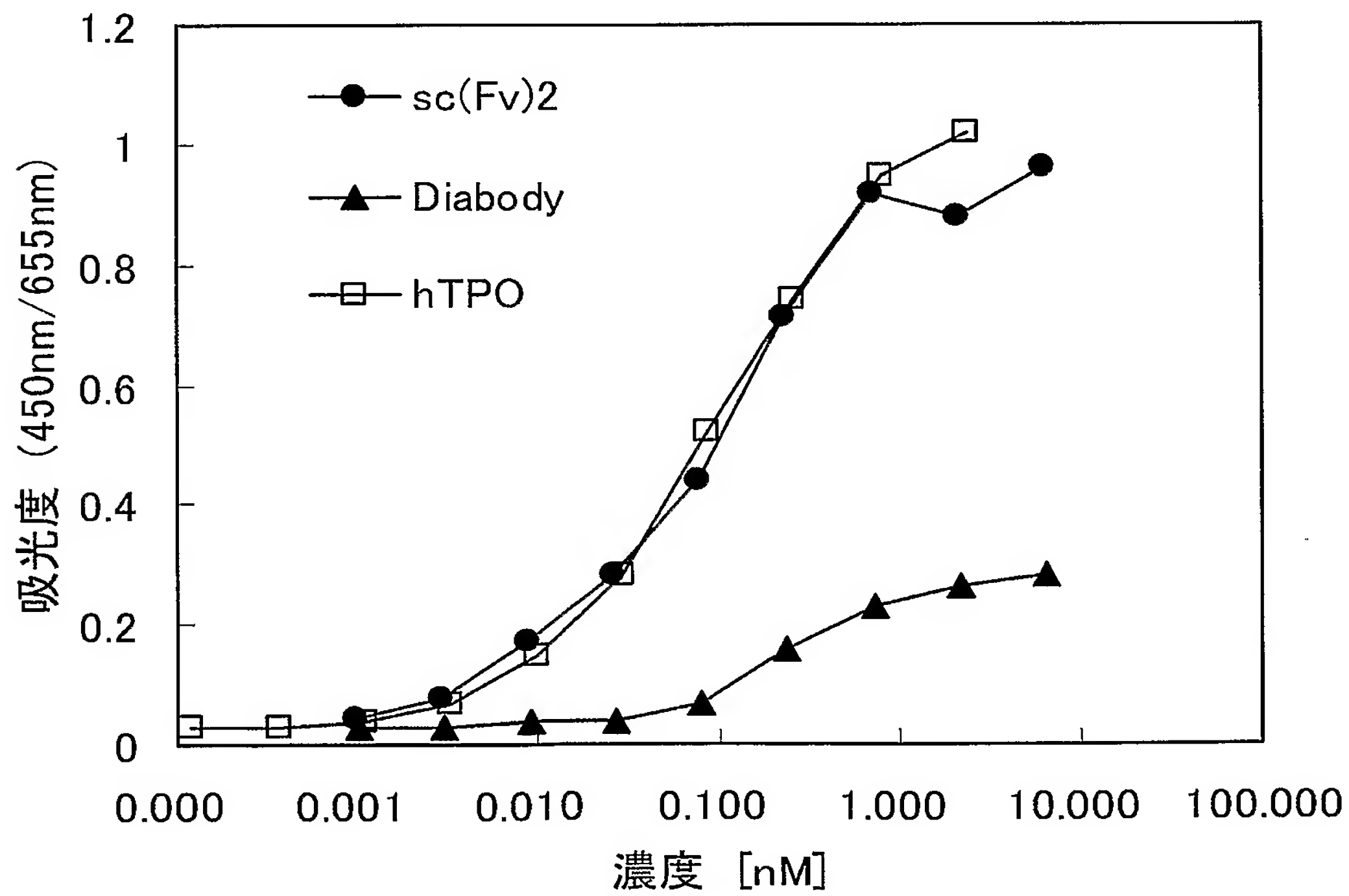
【図 6】



【図 7】



【図 8】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 2 つ以上の重鎖可変領域と、2 つ以上の軽鎖可変領域をリンカーで結合し、一本鎖ポリペプチドにすることにより、抗体の活性を増強させる方法の提供を課題とする。

【解決手段】 抗ヒトMpl抗体を取得・精製し、更に遺伝子工学的手法を用いて抗ヒトMpl抗体の一本鎖抗体を作製した。該抗体は高いアゴニスト活性を示した。このことは、2 つ以上の重鎖可変領域と、2 つ以上の軽鎖可変領域をリンカーで結合し、一本鎖ポリペプチドにすることにより抗体の活性を増強できることを示している。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 4 1 5 7 6 0

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 3 3 1 1]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 9 月 5 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都北区浮間 5 丁目 5 番 1 号

氏 名

中外製薬株式会社